



Avaliação da hemocompatibilidade *in vitro* de compostos à base de hidroxiapatite e de quitosano, de origem natural

Sérgio Bruno Ramos Rodrigues

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos conducente ao Grau de Mestre em Toxicologia Analítica Clínica e Forense apresentado na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Laboratório de Bioquímica do Departamento de Ciências Biológicas, da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Trabalho realizado sob a orientação do Professor Doutor Elísio Manuel de Sousa Costa e coorientação da Professora Doutora Maria Alice dos Santos Silva Gomes Martins

Universidade do Porto

Julho de 2016

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

*Cada um cumpre o destino que lhe cumpre,
E deseja o destino que deseja;
Nem cumpre o que deseja,
Nem deseja o que cumpre.*

*Como as pedras na orla dos canteiros
O Fado nos dispõe, e ali ficamos;
Que a sorte nos fez postos
Onde houvermos de sê-lo.*

*Não tenhamos melhor conhecimento
Do que nos coube que de que nos coube.
Cumpramos o que somos.
Nada mais nos é dado.*

Ricardo Reis, in “Odes”
Heterónimo de Fernando Pessoa

Agradecimentos

A concretização desta Dissertação de Mestrado só foi possível graças ao valioso contributo de inúmeras pessoas e instituições, às quais gostaria de expressar algumas palavras de profundo agradecimento:

As minhas primeiras palavras de agradecimento são naturalmente dirigidas ao Professor Doutor Elísio Costa, orientador desta dissertação, para lhe agradecer a confiança que em mim deposita ao manifestar com entusiasmo e interesse a sua disponibilidade para orientar este trabalho, e também por continuar presente no meu percurso académico. Gostaria ainda de enaltecer a incansável orientação científica, pelos oportunos conselhos e revisão crítica do texto, pela sua contagiante boa disposição no local de trabalho e pela motivação e os incentivos constantes que se tornaram fundamentais em determinantes etapas da elaboração desta dissertação. Para além de toda a sua amizade demonstrada ao longo desta desafiante e profícua jornada.

À Professora Doutora Alice Santos Silva, gostaria de lhe agradecer o privilégio de a poder ter como minha coorientadora. Agradeço também a forma pronta e simpática com que me recebeu, pela disponibilidade e profissionalismo, pela enriquecedora contribuição científica e capacidade de crítica construtiva. Saliento ainda o carinho demonstrado nas suas palavras de incentivo ao longo deste ano de trabalho.

À Professora Doutora Clara Piccirillo, gostaria de lhe agradecer a afetuosa receção, os conhecimentos que me transmitiu e a forma entusiasmada com que o fez, a cedência e indicação de bibliografia relevante à elaboração desta dissertação, e por todo o apoio laboratorial que me proporcionou sem o qual teria sido muito mais difícil.

À Professora Doutora Manuela Pintado, com quem tive o orgulho e o privilégio de colaborar, gostaria em primeiro lugar de lhe agradecer pela tão terna receção e por todos os estímulos e desafios propostos para a realização deste projeto de investigação, assim como os conhecimentos que me transmitiu e o espírito crítico com que sempre analisou os resultados obtidos. Gostaria ainda de evidenciar o entusiasmo demonstrado e os incentivos constantes ao longo de todo o trabalho.

À Professora Doutora Ana Oliveira, gostaria de lhe agradecer não só a amabilidade com que me recebeu, como a disponibilidade e entusiasmo demonstrados, bem como a imprescindível colaboração neste projeto de investigação.

À Professora Doutora Susana Coimbra, agradeço a disponibilidade e valiosa colaboração que em muito contribuiu para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Doutor Flávio Reis, gostaria de lhe agradecer o entusiasmo demonstrado e as palavras de incentivo que sempre foram muito apreciadas por mim.

Ao Laboratório de Bioquímica, do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (FFUP), e ao Laboratório de Microbiologia, do Centro de Biotecnologia e Química Fina (CBQF) da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa (ESB-UCP), agradeço não só o suporte financeiro imprescindível para que este projeto fosse realizado, assim como todo o equipamento disponibilizado.

Às minhas colegas de laboratório e amigas, Ângela Rego e Sara de Sousa Sá, agradeço a amizade, o espírito de entreajuda e o constante encorajamento ao longo deste ano de trabalho.

Aos restantes colegas de laboratório, colaboradores e funcionários, gostaria de lhes agradecer o apoio prestado e o ambiente descontraído e cientificamente estimulante que proporcionaram. Um agradecimento especial à Bárbara Duarte pelo auxílio nas colheitas, à Cristina Amaral e Marta Almada pela assistência no citómetro de fluxo e, à Ana Paula e Casimira Vieira pela simpatia e apoio logístico que gentilmente dedicaram.

Por último, mas não menos importante, agradeço à minha família, em especial aos meus pais e irmão, pelo apoio incondicional e compreensão inestimável, pelos diversos sacrifícios suportados e por estarem sempre presentes em determinantes etapas da minha vida. A eles, dedico todo este trabalho.

O meu sincero OBRIGADO!

Resumo

Atualmente, os biomateriais são utilizados ubiquitariamente nas mais diversas aplicações biomédicas, dada a sua inequívoca importância no tratamento de algumas patologias e alterações associadas ao envelhecimento natural dos sistemas biológicos, o que tem permitido uma diminuição do risco de morbidade e mortalidade. Além disso, recentes investigações têm sido direcionadas para a identificação de potenciais materiais biomédicos com características biomiméticas, ou seja, capazes de mimetizar os fenômenos biológicos, onde os materiais de origem natural se destacam nas avaliações *in vitro* e *in vivo* de biocompatibilidade e hemocompatibilidade.

Os objetivos deste estudo foram caracterizar e comparar compostos à base de hidroxiapatite e quitosano de origem natural através de estudos hemolíticos e hemostáticos *in vitro* de acordo com a ISO 10993 – *Biological Evaluation of Medical Devices*.

No geral, os nossos resultados mostram que a hidroxiapatite obtida por calcinação a 900°C e 1000°C é hemolítica (percentagem de hemólise superior a 5%) tanto na forma de pó como em pastilha e não é trombogénica de acordo com os estudos hemostáticos realizados, e a hidroxiapatite obtida por calcinação a 1100°C e 1200°C não é hemolítica (percentagem de hemólise inferior a 2%) tanto na forma de pó como em pastilha e também não é trombogénica. Relativamente aos compostos à base de quitosano, o quitosano de alto peso molecular foi mais trombogénico do que o quitosano de baixo peso molecular em todas as concentrações testadas.

Abstract

Currently, biomaterials are ubiquitously used for many biomedical applications, due to its clear importance in the treatment of certain pathologies and changes associated with the natural aging of biological systems, which has allowed a reduction in the risk of morbidity and mortality. Furthermore, recent investigations are being directed to the identification of potential biomedical materials with biomimetic features, which are able to mimic the biological phenomena where naturally occurring materials stand out in both *in vitro* and *in vivo* biocompatibility and hemocompatibility evaluations.

The aims of this study were to characterize and compare hydroxyapatite and chitosan-based compounds from natural origin by *in vitro* hemolytic and hemostatic studies according to the ISO 10993 – *Biological Evaluation of Medical Devices*.

Overall, our results show that hydroxyapatite obtained by calcination at 900°C and 1000°C is hemolytic (hemolysis rate above 5%) in both powder and pellet form and is non-thrombogenic according to all hemostatic studies, and hydroxyapatite obtained by calcination at 1100°C and 1200°C is non-hemolytic (hemolysis rate below 2%) in both powder and pellet form and also is non-thrombogenic. Concerning chitosan-based compounds, chitosan of high molecular weight was more thrombogenic than chitosan of low molecular weight in all tested concentrations.

Índice

Agradecimentos	VII
Resumo	IX
Abstract	X
Lista de Abreviaturas	XIII
Lista de Figuras	XV
Lista de Tabelas	XVIII
Parte I: Introdução	1
1. Hemostase.....	3
1.1. Hemostase primária.....	4
1.2. Hemostase secundária.....	7
1.2.1. Via intrínseca.....	9
1.2.2. Via extrínseca.....	9
1.2.3. Via comum.....	10
1.2.4. Cascata fisiológica da coagulação.....	11
1.2.5. Mecanismos de regulação da coagulação.....	12
1.3. Hemostase terciária.....	13
2. Biomateriais.....	14
2.1. Definição de biomaterial.....	14
2.2. Enquadramento evolutivo.....	15
2.3. Classificação dos biomateriais.....	16
2.4. Avaliação biológica dos dispositivos médicos.....	18
3. Hidroxiapatite.....	19
3.1. Caracterização do biomaterial.....	19
3.2. Avaliação da hemocompatibilidade <i>in vitro</i> da HAp.....	21
3.3. Principais aplicações e perspetivas futuras.....	23
4. Quitosano.....	24
4.1. Caracterização do biomaterial.....	24
4.2. Avaliação da hemocompatibilidade <i>in vitro</i> do Qs.....	25
4.3. Principais aplicações e perspetivas futuras.....	27

Parte II: Objetivos	29
Parte III: Materiais e Métodos	33
1. Preparação e caracterização das amostras	35
2. Avaliação <i>in vitro</i> da hemocompatibilidade	36
2.1. Estudo das propriedades hemolíticas	36
2.1.1. Teste de hemólise	36
2.2. Estudo das propriedades hemostáticas	37
2.2.1. Hemostase primária	37
2.2.1.1. <i>Scanning Electron Microscopy</i>	37
2.2.1.2. Quantificação da ativação plaquetária	38
2.2.2. Hemostase secundária	38
2.2.2.1. Teste do TTPa e TP	38
2.2.2.2. Tempo de coagulação do sangue total	39
2.2.2.3. Tempo de recalcificação do plasma	39
3. Análise estatística	40
Parte IV: Resultados	41
Capítulo I – Hidroxiapatite	43
1. Avaliação <i>in vitro</i> da hemocompatibilidade	43
1.1. Estudo das propriedades hemolíticas	43
1.1.1. Teste de hemólise	43
1.2. Estudo das propriedades hemostáticas	44
1.2.1. Hemostase primária	44
1.2.2. Hemostase secundária	46
Capítulo II – Quitosano	48
1. Avaliação <i>in vitro</i> da hemocompatibilidade	48
1.1. Estudo das propriedades hemostáticas	48
1.1.1. Hemostase primária	48
1.1.2. Hemostase secundária	49
Parte V: Discussão	53
Parte VI: Referências	59

Lista de Abreviaturas

APt	Ativador do plasminogénio tecidular
APu	Ativador do plasminogénio urinário
ATIII	Antitrombina III
AVC	Acidente vascular cerebral
BHE	Barreira hematoencefálica
CID	Coagulação intravascular disseminada
CIAp	Cloroapatite
EAM	Enfarte agudo do miocárdio
ECP	Estimulação cerebral profunda
EP	Embolia pulmonar
FAp	Fluoroapatite
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FpA	Fibrinopéptido A
FpB	Fibrinopéptido B
FT	Fator tecidular
FTC	Fosfato tricálcico
FvW	Fator de von Willebrand
HAp	Hidroxiapatite
IAP	Inibidores dos ativadores do plasminogénio
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
IVFT	Inibidor da via do fator tecidular
NIH	<i>American National Institute of Health</i>

PC	Proteína C
PDF	Produtos de degradação da fibrina
PS	Proteína S
PTFE	Politetrafluoroetileno
QAPM	Quininogénio de alto peso molecular
Qs	Quitosano
QsAPM	Quitosano de alto peso molecular
QsBPM	Quitosano de baixo peso molecular
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
S.E.M.	<i>Standard error of the mean</i>
SNC	Sistema nervoso central
TP	Tempo de protrombina
TTPa	Tempo de tromboplastina parcial ativada
TVP	Trombose venosa profunda

Lista de Figuras

Figura 1 – Rutura do endotélio vascular com exposição das fibras de colagénio à superfície.....	4
Figura 2 – Vasoconstrição ativa promovida pelas secreções plaquetárias.....	5
Figura 3 – Sequência dos eventos da hemostase primária.....	6
Figura 4 – Trombo plaquetário.....	6
Figura 5 – Via intrínseca da cascata da coagulação.....	9
Figura 6 – Via extrínseca da cascata da coagulação.....	10
Figura 7 – Via comum da cascata da coagulação.....	10
Figura 8 – Cascata fisiológica da coagulação e seus mecanismos de regulação.....	12
Figura 9 – Sistema fibrinolítico e seus mecanismos de regulação.....	14
Figura 10 – Estrutura química dos polímeros naturais de Quitina e Quitosano (Qs)..	24
Figura 11 – Atividade hemolítica (%) das amostras de HAp apresentadas sob a forma de pastilha e pó, calcinadas entre 900°C e 1200°C.....	43
Figura 12 – Imagens de SEM retiradas à superfície das pastilhas de HAp calcinadas a 900°C (A), 1000°C (B), 1100°C (C) e 1200°C (D), às pastilhas NeoBone® calcinadas a 700°C (E), às pastilhas CAPTAL® calcinadas a 700°C (F), ao PTFE (G) e ao Vidro (H), para visualização da adesão e ativação plaquetárias.....	44
Figura 13 – Comparação do efeito induzido pelas pastilhas e pós de HAp calcinados a diferentes temperaturas, pelo controlo negativo (PTFE) e controlo positivo (Vidro) na ativação das plaquetas, atendendo à % de plaquetas marcadas positivamente com CD62P/P-seletina.....	45
Figura 14 – Comparação do efeito induzido pelas pastilhas e pós de HAp calcinados a diferentes temperaturas, pelo controlo negativo (PTFE) e controlo positivo (Vidro) na ativação das plaquetas, ao averiguar a intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias) proveniente das plaquetas ativadas.....	45

Figura 15 – Comparação do efeito induzido pelas pastilhas e pós de HAp calcinados a diferentes temperaturas e pelo controlo negativo (PTFE) no tempo de coagulação, nomeadamente no TTPa.....	46
Figura 16 – Comparação do efeito induzido pelas pastilhas e pós de HAp calcinados a diferentes temperaturas e pelo controlo negativo (PTFE) no tempo de coagulação, nomeadamente no TP.....	46
Figura 17 – Comparação do efeito induzido pelas pastilhas de HAp calcinadas a diferentes temperaturas, pelo controlo negativo (PTFE) e controlo positivo (Vidro) na cinética de coagulação do sangue total.....	47
Figura 18 – Comparação do efeito induzido pelos pós de HAp calcinados a diferentes temperaturas, pelo controlo negativo (PTFE) e controlo positivo (Vidro) na cinética de coagulação do sangue total.....	47
Figura 19 – Comparação do efeito induzido pelos pós de HAp calcinados a diferentes temperaturas (na concentração de 0,05 mg/mL) e pelo controlo positivo no tempo médio máximo da cinética de coagulação.....	47
Figura 20 – Comparação do efeito induzido pelas soluções de QsAPM e QsBPM a diferentes concentrações na ativação das plaquetas, atendendo à % de plaquetas marcadas positivamente com CD62P/P-seletina.....	48
Figura 21 – Comparação do efeito induzido pelas soluções de QsAPM e QsBPM a diferentes concentrações na ativação das plaquetas, ao averiguar a intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias) proveniente das plaquetas ativadas.....	48
Figura 22 – Comparação do efeito induzido pelas soluções de QsAPM e QsBPM a diferentes concentrações, pelo branco e controlo negativo (PTFE) no tempo de coagulação, nomeadamente no TTPa.....	49
Figura 23 – Comparação do efeito induzido pelas soluções de QsAPM e QsBPM a diferentes concentrações, pelo branco e controlo negativo (PTFE) no tempo de coagulação, nomeadamente no TP.....	50
Figura 24 – Comparação do efeito induzido pelas soluções de QsAPM a diferentes concentrações, pelo branco, controlo negativo (PTFE) e controlo positivo (Vidro) na cinética de coagulação do sangue total.....	50

- Figura 25** – Comparação do efeito induzido pelas soluções de QsBPM a diferentes concentrações, pelo branco, controlo negativo (PTFE) e controlo positivo (Vidro) na cinética de coagulação do sangue total.....50
- Figura 26** – Comparação do efeito induzido pelas soluções de QsAPM e QsBPM a diferentes concentrações, pelo branco e pelo controlo positivo no tempo médio máximo da cinética de coagulação..... 51

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Componentes das reações de coagulação sanguínea.....	8
Tabela 2 – Resumo das principais categorias de teste e respectivos métodos de avaliação da hemocompatibilidade <i>in vitro</i> de amostras de HAp.....	22
Tabela 3 – Resumo das principais categorias de teste e respectivos métodos de avaliação da hemocompatibilidade <i>in vitro</i> de amostras de Qs.....	26
Tabela 4 – Principais aplicações da quitina, Qs e seus derivados.....	28

Parte I

Introdução

1. Hemostase

Atualmente os biomateriais são utilizados ubiqüitariamente nas mais diversas aplicações biomédicas, dada a sua inequívoca importância na prevenção e tratamento de algumas patologias e na mitigação de alterações associadas ao envelhecimento natural dos sistemas biológicos. Contudo, nas aplicações em que ocorra contacto íntimo e continuado com o sangue, os biomateriais podem adsorver à sua superfície proteínas sanguíneas responsáveis pelos fenómenos de adesão, ativação e consequente agregação das plaquetas com concomitante formação de trombos plaquetários de magnitude variável.¹ A formação destes trombos à superfície dos biomateriais poderá resultar em graves e irreversíveis alterações, quer no local de implantação do referido dispositivo médico ou em consequência da migração desses trombos para locais mais afastados do organismo, podendo afetar órgãos vitais altamente vascularizados como o cérebro ou o coração, colocando em risco de vida os doentes tratados.²

Apesar do progresso científico e tecnológico, as doenças tromboembólicas continuam a ser a principal causa de morbilidade e mortalidade à escala mundial, sendo o enfarte agudo do miocárdio (EAM), os acidentes vasculares cerebrais (AVC), a trombose venosa profunda (TVP) e a embolia pulmonar (EP) as complicações mais comuns.³⁻⁷ De modo a evitar que estas ou outras doenças tromboembólicas possam ocorrer pelo uso inadequado dos biomateriais e dispositivos médicos nas aplicações pretendidas, torna-se necessário proceder a uma prévia e minuciosa avaliação da sua hemocompatibilidade antes do eventual uso em biomedicina.⁸ No sentido de esclarecer a importância dessa avaliação é necessário compreender o funcionamento da hemostase, a qual é responsável não só pela proteção do sistema vascular em caso de lesão, como também pela manutenção da fluidez sanguínea, ao proporcionar um adequado balanço entre as atividades pró-coagulantes e anticoagulantes.^{6,9}

Uma hemorragia ocorre na sequência da rutura do endotélio vascular com exposição das fibras de colagénio à sua superfície (Figura 1) e, como a pressão intravascular é superior à extravascular, o sangue extravasa.¹⁰ De forma a assegurar o adequado controlo sobre estas hemorragias, o organismo dispõe de um sistema hemostático evoluído e complexo que vai rapidamente atuar nos locais de lesão para bloquear a saída do sangue, permitindo a reparação dos tecidos lesados e o restabelecimento das suas funções.¹¹ Esta intervenção é levada a cabo pelos principais componentes deste sistema, nomeadamente o mecanismo dependente das plaquetas (hemostase primária), a coagulação sanguínea ou “cascata da coagulação” (hemostase secundária) e a fibrinólise (hemostase terciária).¹²

A ação conjunta dos diferentes mecanismos do sistema hemostático culmina na formação de um coágulo de fibrina (ou tampão hemostático) que em condições fisiológicas deve se formar rapidamente, possuir a estabilidade necessária para garantir uma adesão firme à região lesada e a durabilidade bastante para coibir a hemorragia, possibilitando a reparação dos tecidos.¹²

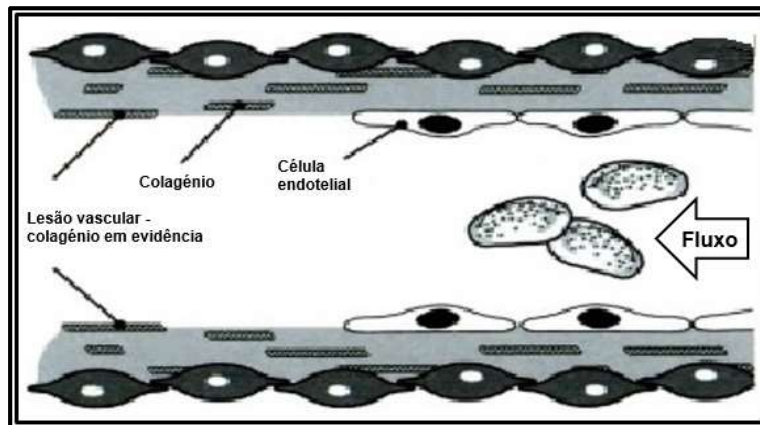


Figura 1 – Rutura do endotélio vascular com exposição das fibras de colagénio à superfície. Adaptado de ¹⁰

1.1. Hemostase primária

Na sequência de uma hemorragia ocorre uma rápida resposta fisiológica envolvendo o vaso lesado, as plaquetas e as proteínas da coagulação. A hemostase primária (um fenómeno auto-amplificado, mas localizado) surge no início desta resposta apresentando essencialmente duas fases distintas, uma fase vascular e outra plaquetária. A fase vascular é caracterizada pela vasoconstrição, primeiro de uma forma passiva devido à elasticidade da parede e depois de forma ativa em consequência da ligação das plaquetas às fibras de colagénio expostas à superfície do subendotélio. Essa adesão é responsável pela ativação das plaquetas que libertam agentes vasoconstritores, nomeadamente a serotonina e o tromboxano A₂, que contribuem pela manutenção da contração do vaso (Figura 2). Por sua vez, a fase plaquetária consiste no conjunto de eventos que promovem a adesão e ativação das plaquetas, com consequente secreção e agregação de mais plaquetas ao local lesado até à formação do trombo plaquetário.¹⁰ Trata-se de uma resposta transiente e que permite não só uma redução do fluxo sanguíneo da área afetada, pela diminuição do calibre dos pequenos vasos (capilares, arteríolas e vénulas) atenuando as perdas hemorrágicas, assim como a manutenção das superfícies endoteliais adjacentes.¹³

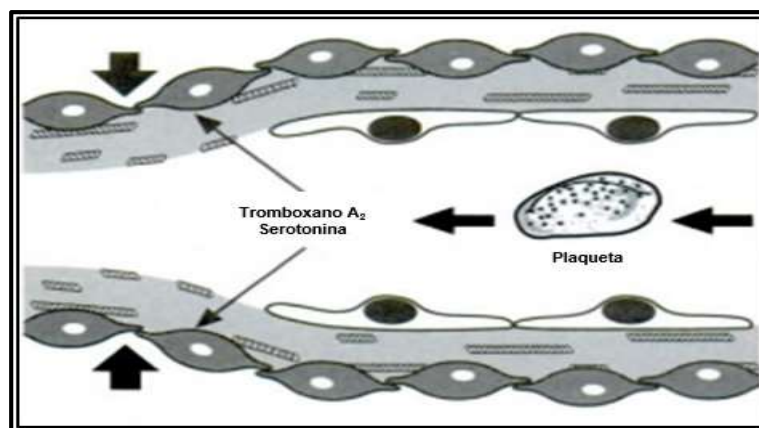


Figura 2 – Vasoconstrição ativa promovida pelas secreções plaquetárias. Adaptado de ¹⁰

À medida que o sangue flui através da rutura do vaso lesado para o espaço extravascular, ocorre uma contínua exposição deste às estruturas subendoteliais que promovem a adesão e subsequente ativação das plaquetas. O processo de adesão é estabelecido entre as plaquetas circulantes e as fibras de colagénio expostas à superfície do subendotélio, por intermédio do Fator de von Willebrand (FvW), visto que em condições fisiológicas normais o endotélio vascular não permite a ocorrência de adesão plaquetária por este ter uma carga negativa, a qual é responsável pela repulsão eletrostática.^{14,15} Por sua vez, as plaquetas que aderem à superfície subendotelial são ativadas pelas fibras de colagénio resultando em múltiplas modificações morfológicas e bioquímicas. Estas transformações compreendem não só a mudança da forma discóide da plaqueta numa forma esférica com diversas projeções de comprimentos variáveis (pseudópodes), como a exposição dos recetores membranares para a ligação do fibrinogénio e do FvW (glicoproteínas Ib e IIb/IIIa), a secreção de agentes agregantes (fibrinogénio e FvW) contidos nos grânulos plaquetários, agentes coagulantes (fosfolípidos plaquetários) que participam na ativação dos fatores V e X, favorecendo a formação da rede de fibrina no local da lesão, agentes vasoconstritores (serotonina e tromboxano A₂) que atuam na manutenção da contração do vaso lesado, entre outras, bem como o rearranjo das membranas plasmáticas e intracelulares (Figura 3).^{10,11,14}

Os fenómenos de vasoconstrição passiva e ativa amplificam os processos de adesão e ativação das plaquetas, uma vez que a diminuição do calibre dos pequenos vasos e a consequente redução do fluxo sanguíneo promove uma maior permanência dos elementos sanguíneos no local da lesão, nomeadamente as plaquetas, os eritrócitos, os cofatores plasmáticos, os fatores de coagulação e as enzimas que as ativam.

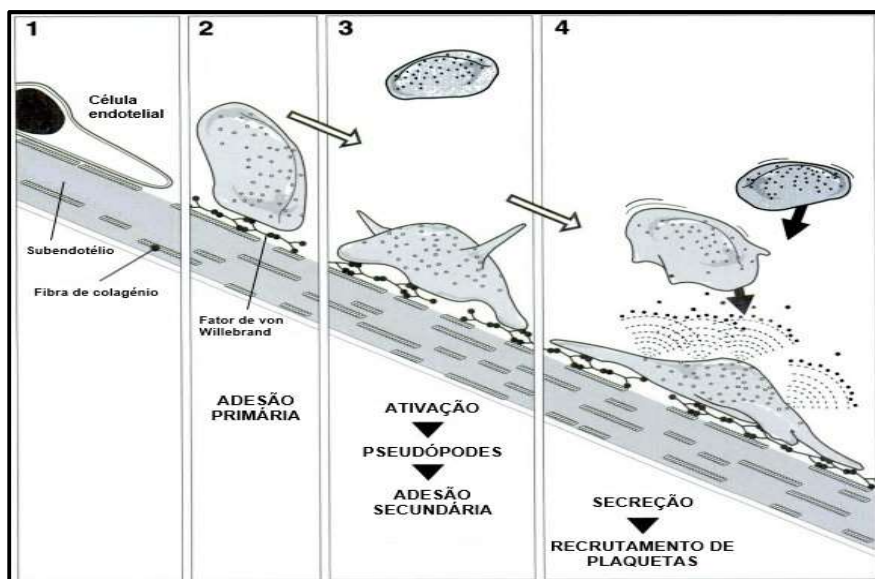


Figura 3 – Sequência dos eventos da hemostase primária. Adaptado de ¹⁰

Os eventos que compõem a hemostase primária culminam na formação de um tampão plaquetário que irá coibir rapidamente as perdas hemorrágicas e ativar a coagulação sanguínea ou cascata da coagulação (hemostase secundária). Nesse sentido, é fundamental que as plaquetas adiram firmemente à região lesada e ocorra a sua estimulação pelos agonistas primários (fibras de colagénio e trombina) para que libertem do conteúdo dos grânulos plaquetários os agentes agregantes (fibrinogénio e FvW) indispensáveis para o recrutamento de mais plaquetas até à formação de um trombo plaquetário estável (Figura 4).

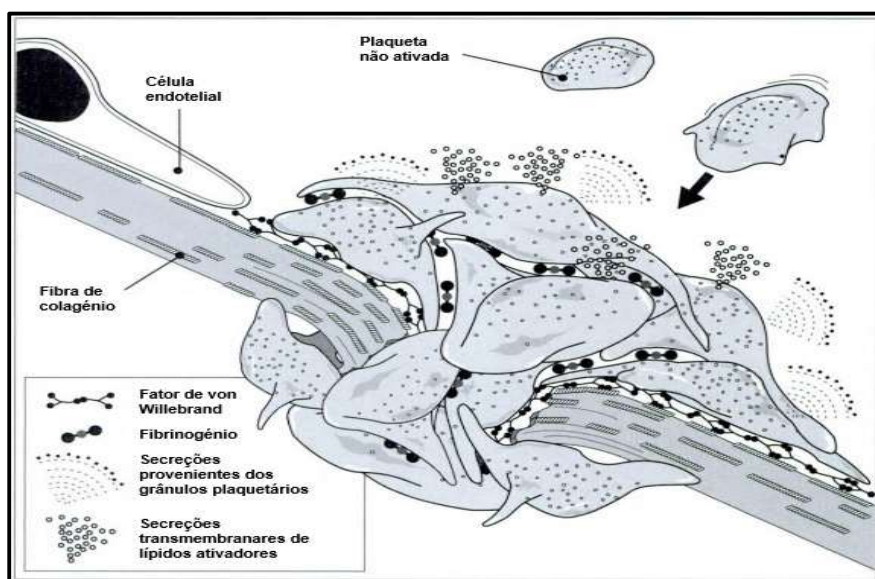


Figura 4 – Trombo plaquetário. Adaptado de ¹⁰

1.2. Hemostase secundária

À medida que os eventos da hemostase primária se sucedem, ocorre uma ativação da coagulação sanguínea ou cascata da coagulação (hemostase secundária). Essa ativação é responsável pelo desencadeamento de um conjunto de reações enzimáticas sucessivas que culminam na formação de um polímero de fibrina insolúvel, o qual se associa ao tampão plaquetário dando origem ao coágulo sanguíneo.¹⁶ Os intervenientes destas reações sequenciais são proteínas plasmáticas, sendo que os substratos (fatores de coagulação inativos ou zimogénios) são ativados por proteólise e cuja forma ativa será a protease da reação seguinte. Para além deste conjunto de reações enzimáticas, os zimogénios e as respetivas formas ativas também se envolvem na formação de complexos membranares com a colaboração de iões de cálcio (Ca^{2+}). Desta forma é possível assegurar não só um aumento da concentração local de todos os intermediários da cascata, como a sequência natural das reações em que participam, assim como uma amplificação da velocidade global dessas mesmas reações.¹¹

Os fatores de coagulação da hemostase secundária encontram-se organizados, segundo numeração romana, pela ordem cronológica em que estes foram descobertos (Tabela 1). Por outro lado, esta numeração facilita a referência aos diferentes zimogénios, e suas formas ativas pela adição do sufixo “a” imediatamente após o algarismo romano.

No sentido de clarificar as complexas interações envolvidas entre todos os componentes mencionados (Tabela 1), é necessário efetuar uma análise cuidada às diversas vias que compõem a clássica cascata da coagulação, nomeadamente as vias intrínseca, extrínseca e comum. A via intrínseca (ou de contacto) é desencadeada pelo contacto com superfícies carregadas negativamente, enquanto a via extrínseca (ou dependente do fator tecidual) é iniciada em contexto de uma lesão vascular. Por sua vez, a via comum surge da convergência das vias anteriores assim que o fator X é ativado, etapa indispensável para a formação de trombina.

Tabela 1 – Componentes das reações de coagulação sanguínea. Adaptado de ¹⁷

Fatores Plasmáticos		
Número ou Nome	Sinónimo	Função
I	Fibrinogénio	Percursor da fibrina
II	Protrombina	Percursor da trombina
V	Proacelerina	Ativado é cofator do fator Xa no complexo da protrombinase
VII	Proconvertina	Liga-se ao fator tecidual e ativa os fatores IX e X
VIII	Fator anti-hemofílico	Ativado é cofator do fator IXa no complexo que ativa o fator X
IX	Fator Christmas	Ativado funciona como enzima no complexo que ativa o fator X
X	Fator Stuart-Prower	Ativado funciona como enzima no complexo da protrombinase que ativa a protrombina
XI	Antecedente da tromboplastina plasmática	Ativado participa na reação que ativa o fator IX na presença de iões de Ca^{2+}
Precalicroína (*)	Fator de Fletcher	Circula em complexo bimolecular com o quininogénio de alto peso molecular e participa em reação recíproca onde é ativado a calicroína pelo fator XIIa
Quininogénio de alto peso molecular (QAPM) (*)	Fator de Fitzgerald	Circula em complexo bimolecular com a precalicroína
XII	Fator de Hageman	Ativado pelo contacto com superfícies, calicroína ou outros fatores, o fator XIIa ativa a precalicroína e o fator XI
XIII	Fator de estabilizador da fibrina	Ativado pela trombina forma ligações peptídicas entre monómeros de fibrina solúvel para forma um polímero de fibrina insolúvel, o qual confere estabilidade necessária ao coágulo sanguíneo
Fatores da Superfície Celular		
Número ou Nome	Sinónimo	Função
III	Fator tecidual (FT) ou Tromboplastina	Liga-se ao fator VIIa que inicia a via extrínseca
Fosfolípidos pró-coagulantes (*)	-	Integram no complexo que ativa o fator X e no complexo que ativa a protrombina
Trombomodulina (*)	-	Recetor endotelial específico de ligação à trombina

(*): Ao contrário dos demais, estes componentes são normalmente referidos pelo seu nome.

1.2.1. Via intrínseca

A via intrínseca (ou de contacto) corresponde à via da cascata da coagulação que é ativada pelo contacto com superfícies carregadas negativamente, e cujos fatores de coagulação envolvidos se encontram presentes no sangue. Esta ativação ocorre quando o fator XII, o quinogénio de alto peso molecular (QAPM) e a precalicreína formam um complexo com as fibras de colagénio subendoteliais ou com as superfícies de corpos estranhos, tal como se sucede com os biomateriais.¹⁸ Uma vez associado ao QAPM o fator XII é convertido na sua protease ativa (fator XIIa), a qual é responsável pela conversão do fator XI na sua protease ativa (fator XIa), que por sua vez converte o fator IX na respetiva protease ativa (fator IXa). A protease IXa juntamente com o cofator VIIIa, e na presença dos iões de cálcio (Ca^{2+}) e dos fosfolípidos pró-coagulantes catalisa a reação de ativação do fator X (Figura 5).

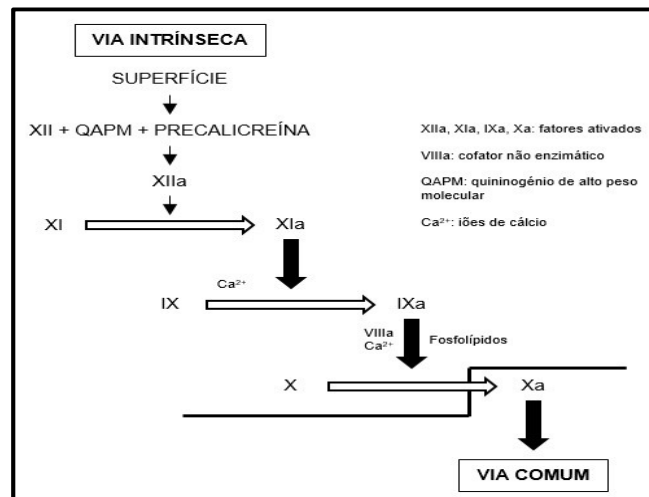


Figura 5 - Via intrínseca da cascata da coagulação. Adaptado de ¹⁰

1.2.2. Via extrínseca

A via extrínseca (ou dependente do fator tecidual) representa a via da cascata da coagulação que é ativada na sequência de uma lesão vascular, e cujos fatores de coagulação se encontram igualmente presentes no sangue. Esta ativação é desencadeada quando o fator VII se associa ao fator tecidual (ou tromboplastina), uma lipoproteína presente nas membranas celulares, e forma com este um complexo que na presença dos iões de cálcio (Ca^{2+}) ativa o próprio fator VII. Por sua vez, o fator VIIa em complexo formado com o fator tecidual, e na presença dos iões de cálcio (Ca^{2+}), ativa o fator X (Figura 6).

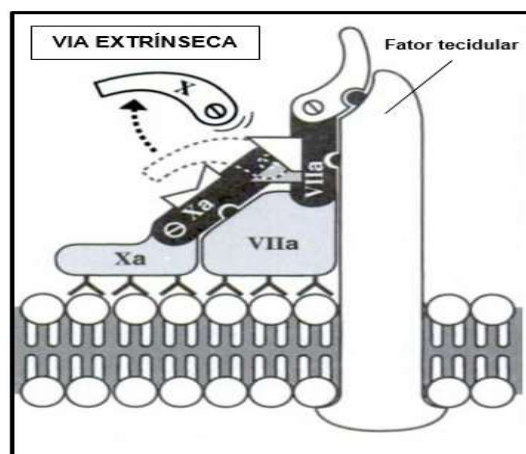


Figura 6 - Via extrínseca da cascata da coagulação. Adaptado de ¹⁰

1.2.3. Via comum

A via comum resulta da convergência das vias intrínseca e extrínseca após clivagem proteolítica do fator X, obtendo-se a respetiva protease ativa (fator Xa). A protease Xa juntamente com o cofator Va, e na presença dos iões de cálcio (Ca^{2+}) e dos fosfolípidos pró-coagulantes formam o complexo protrombinase que converte a protrombina em trombina, a qual por sua vez degrada o fibrinogénio que liberta dois fibrinopéptidos A (FpA) e dois B (FpB) dando origem aos monómeros de fibrina solúvel. Para além da degradação do fibrinogénio, a trombina converte o fator XIII na sua forma ativa (fator XIIIa), que é indispensável para o estabelecimento de ligações covalentes coesas entre os monómeros de fibrina solúvel, conduzindo à formação do polímero de fibrina insolúvel capaz de proporcionar estabilidade ao tampão plaquetário (Figura 7).

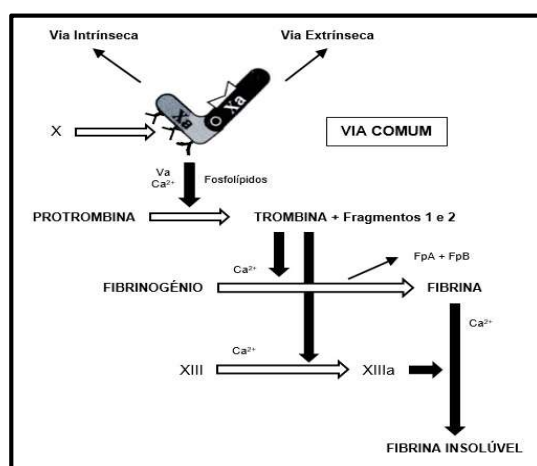


Figura 7 - Via comum da cascata da coagulação. Adaptado de ¹⁰

1.2.4. Cascata fisiológica da coagulação

O clássico modelo da cascata da coagulação descreve as interações bioquímicas ocorridas entre os diversos fatores de coagulação com base em duas vias distintas, nomeadamente as vias intrínseca e extrínseca, que culminam na formação de um coágulo de fibrina estável. Todavia, o modelo inicialmente descrito não apresentava uma explicação para o facto dos doentes hemofílicos manifestarem graves hemorragias tendo uma via extrínseca sem qualquer problema. Para além disso, o facto da deficiência em fator XII não causar hemorragias e da deficiência nos fatores VIII (hemofilia A), IX (hemofilia B) e XI provocarem múltiplos distúrbios hemorrágicos, houve a necessidade de reformular o modelo inicialmente descrito sobre o processo da coagulação.¹⁹

Atualmente o modelo da cascata da coagulação, também conhecido por *Cell-based model*, é descrito como um processo complexo onde se evidencia a existência de uma única via, na qual todos os fatores de coagulação se encontram envolvidos e onde se valoriza o papel das células e das plaquetas ativadas (Figura 8).¹³ Este modelo apresenta genericamente três fases, nomeadamente a iniciação, a amplificação e a propagação. A fase de iniciação é caracterizada pela exposição do fator tecidual ao fluxo sanguíneo após ter ocorrido uma lesão vascular.¹⁸ Essa exposição promove a associação ao fator VII ativando-o (VIIa) e formando com este um complexo que ativa os fatores IX e X. A quantidade de fator Xa produzida é consideravelmente limitada, razão pela qual a concentração de trombina daí proveniente seja igualmente pequena. Por sua vez, na fase de amplificação a pequena concentração de trombina é suficiente para ativar de modo parcial as plaquetas, através da sua ligação aos recetores membranares (glicoproteínas Ib). Essa ligação promove a exteriorização dos fosfolípidos pró-coagulantes e a desgranulação das plaquetas, que conduzem ao recrutamento de mais plaquetas ao local da lesão vascular.¹⁵ Além disso, a trombina está também envolvida na ativação dos zimogénios V e VIII originando os cofatores ativos Va e VIIIa respetivamente. Ambos os cofatores participam na formação de complexos, nomeadamente o complexo tenase que é constituído pelo cofator VIIIa e a protease IXa, e o complexo protrombinase que é composto pelo cofator Va e a protease Xa. O complexo tenase ativa o fator X a uma velocidade de cerca de 50 a 100 vezes superior que o complexo formado entre o fator tecidual e o fator VIIa, enquanto o complexo protrombinase é o principal ativador da protrombina. A trombina que é produzida em resultado desta intervenção ao nível da cascata amplifica a sua própria síntese, ativando o fator XI e completando a ativação das plaquetas e dos cofatores V e VIII. Para além do já referido, a trombina ainda atua na conversão do fibrinogénio em monómeros de fibrina solúvel e na ativação do fator XIII, o

qual é responsável pela formação do coágulo de fibrina insolúvel.²⁰ A fase de propagação, por sua vez, ocorre na superfície das plaquetas e é responsável pela formação da maior parte da trombina.^{21,22}

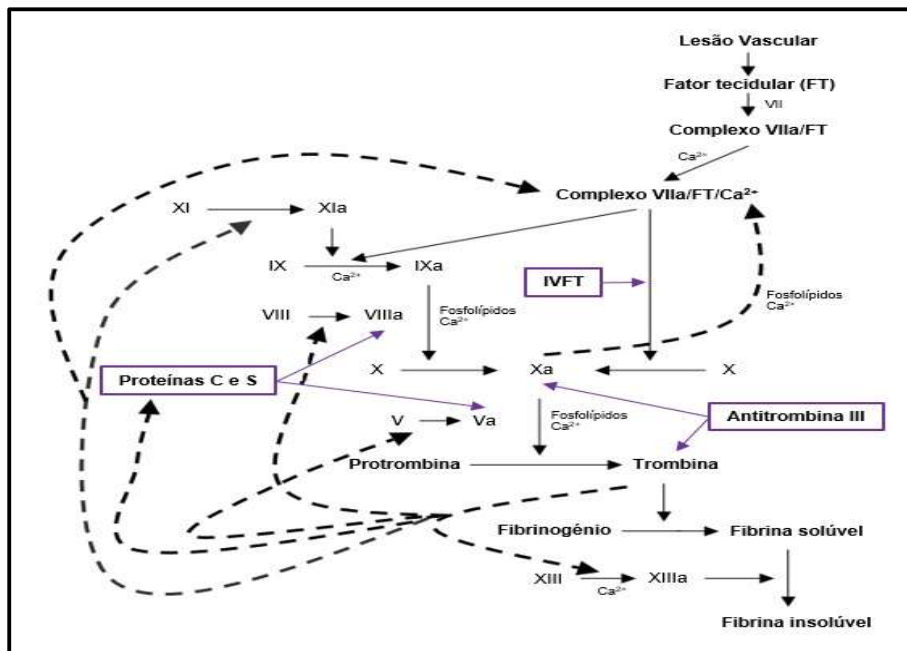


Figura 8 - Cascata fisiológica da coagulação e seus mecanismos de regulação. **Legenda:** → Ativação, --> Amplificação, → Inibição; **IVFT:** Inibidor da via do fator tecidual. Adaptado de ¹³

1.2.5. Mecanismos de regulação da coagulação

Quando ocorre uma hemorragia os mecanismos da coagulação do sistema hemostático são rapidamente acionados no sentido de coibir as perdas hemorrágicas, possibilitando a reparação dos tecidos e o restabelecimento natural das suas funções.¹¹ Estes mecanismos pró-coagulantes são controlados por um conjunto de mecanismos de regulação que inativam as proteases e os cofatores ativos da coagulação (Figura 8). Desta forma é possível não só limitar a quantidade de coágulos de fibrina formados, como também prevenir a ocorrência da coagulação intravascular disseminada (CID).¹³

A antitrombina III (ATIII) é uma proteína produzida no fígado e nas células endoteliais com capacidade para se ligar e inativar diretamente a trombina e indiretamente todas as proteases formadas ao longo dos processos da coagulação. Contudo, as reações de inibição que a ATIII exerce sobre as proteases alvo são muito lentas, pelo que só na presença de heparina ou de glicosaminoglicanos sulfatados similares as reações passam a ser praticamente instantâneas, traduzindo-se no imediato bloqueio da formação dos coágulos de fibrina nos locais onde não tenha ocorrido qualquer lesão vascular. Outro importante agente regulador da coagulação é o inibidor da via do fator tecidual (IVFT), o

qual desempenha a sua inibição ao nível do fator Xa e do complexo formado entre o fator tecidual e o fator VIIa.²⁰ Para além da ATIII e do IVFT a própria trombina, que é conhecida pela sua capacidade de auto-amplificação na cascata da coagulação e de promover os processos pró-coagulantes, se pode converter num agente anticoagulante quando esta forma um complexo com a trombomodulina. Esta associação provoca alterações na conformação da trombina, que se traduz na perda da capacidade de ativação das plaquetas e da sua atividade enquanto protease da cascata da coagulação. Além disso, e em consequência das modificações ocorridas na trombina, a proteína C (PC) é ativada (PCa) e irá exercer a sua atividade reguladora ao nível do fator V e VIII, pelo que esta intervenção é acelerada na presença da proteína S (PS), impedindo que estes zimogénios sejam ativados (Figura 8).

1.3. Hemostase terciária

A fibrinólise (hemostase terciária) é o processo fisiológico que consiste na desagregação e dissolução progressiva dos coágulos de fibrina.¹¹ Os principais agentes fisiológicos ativadores da fibrinólise são o ativador do plasminogénio tecidual (APt) e o ativador do plasminogénio urinário (APu) ou Uroquinase, os quais são sintetizados pelas células endoteliais e cuja função é converter o plasminogénio (adsorvido no coágulo de fibrina) em plasmina que irá degradar, por sua vez, o polímero de fibrina nos produtos de degradação da fibrina (ou PDF). Além disso, a plasmina é também capaz de degradar o fibrinogénio, mas esta reação permanece localizada.¹³

As reações da fibrinólise podem ser condicionadas devido aos inibidores dos ativadores do plasminogénio (IAP) e aos inibidores da plasmina. Os IAP são produzidos pelas células endoteliais e plaquetas ativadas, e atuam sobre os APt inibindo-os diretamente. Os inibidores da plasmina, nomeadamente α_2 -antiplasmina, α_1 -antitripsina e α_2 -macroglobulina, inativam a plasmina livre que escapa do coágulo de fibrina, regulando assim a atividade do plasminogénio associado a fibrina e ativado em plasmina.¹³

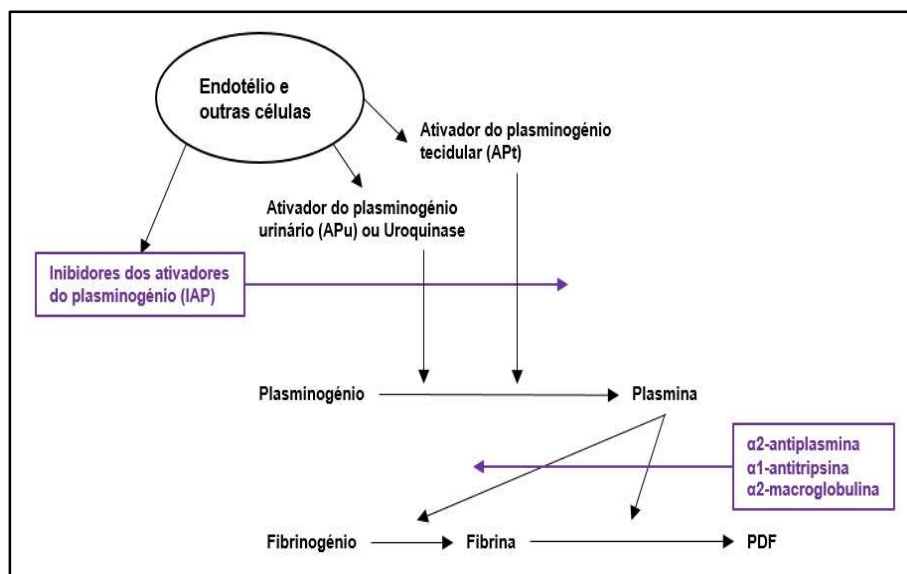


Figura 9 - Fibrinólise e seu mecanismo de regulação. **Legenda:** → Ativação, → Inibição. Adaptado de ¹³

2. Biomateriais

A esperança média de vida à nascença da população mundial tem aumentado de forma significativa ao longo das últimas décadas, em particular desde os anos 60, e com uma previsão de subida destes valores nos anos subsequentes.²³ Contudo, esta crescente expectativa de vida da população está associada não só a um aumento do número de doenças crónicas não transmissíveis, das quais se destacam as doenças cardiovasculares que são as responsáveis pela maior taxa de mortalidade no mundo, assim como o agravamento das afeções preexistentes.^{24,25} De modo a atenuar o impacto destas patologias no ser humano ao longo do tempo, os avanços científicos e tecnológicos têm unido esforços no sentido de oferecer soluções que possam contribuir para uma melhoria contínua da qualidade de vida da sociedade humana.^{26,27} Uma dessas soluções compreende a investigação, o desenvolvimento e a implementação de biomateriais na biomedicina, uma vez que as suas características individuais e cruzadas conferem as propriedades adequadas à sua utilização nas mais diversas aplicações biomédicas, contribuindo desta forma para a redução do risco de morbilidade e mortalidade.^{27,28}

2.1. Definição de biomaterial

Uma das pioneiras e mais consensual definição de biomaterial surgiu da autoria de Williams em 1987, que definiu da seguinte forma: “Um biomaterial é um material não viável usado em dispositivos médicos, de forma a interagir com os sistemas biológicos.”^{29,30}

Embora desatualizada a definição de Williams serviu de base à formulação de novas definições que foram modificando o paradigma da área dos biomateriais. Atualmente a definição de biomaterial é descrita pela *American National Institute of Health* (NIH) como: “Qualquer substância ou combinação de substâncias (exceto fármacos), de origem natural ou sintética, que podem ser usadas durante qualquer período de tempo, como parte ou como sistemas que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo a fim de manter ou melhorar a qualidade de vida do indivíduo.”³¹ No entanto, consoante o contexto em que os biomateriais são utilizados a sua definição é adaptada, tal como acontece quando estes são integrados no fabrico de dispositivos médicos, cuja definição passa a ser descrita pela *Food and Drug Administration* (FDA) como: “Um instrumento, aparelho, equipamento, implante ou outro artigo semelhante ou afim, incluindo qualquer componente, parte ou acessório, o qual é usado no diagnóstico de patologias ou na cura ou na prevenção das mesmas, e o qual não atinge nenhum dos seus propósitos através de reação química, dentro ou sobre o corpo humano ou em outros animais e o qual não é dependente de ser metabolizado para a realização de qualquer uma das suas finalidades.”³²

Resumidamente, um biomaterial é um qualquer material biotolerante, bioinerte, bioativo ou biodegradável dependendo da sua interação com o hospedeiro, de origem natural ou sintética, apresentado na sua forma sólida ou líquida, e destinados às aplicações de contacto com os sistemas biológicos sem que ocorram reações de rejeição, nomeadamente as reações alérgicas, imunológicas, respostas inflamatórias graves, ou mesmo a indução de efeitos genotóxicos com provável ocorrência de mutagenicidade das estruturas circundantes *in loco* da implantação ou a nível sistémico.

2.2. Enquadramento evolutivo

A utilização dos biomateriais na biomedicina já remonta há um longo período de tempo, mas só a partir da década de 40 é que os notórios progressos foram concretizados.²⁶ Um dos principais avanços verificados ao longo dos últimos anos compreende a gradual substituição do uso de metais por tecidos naturais ou seus derivados, uma vez que estes conseguem mais facilmente mimetizar os fenómenos biológicos.²⁷ Além disso, a introdução de conceitos inovadores de bioengenharia teve um particular impacto em alguns dispositivos médicos (como os *pacemakers*) onde o desenvolvimento da tecnologia de sensores e dos algoritmos de *software* possibilitou o controlo das arritmias nos doentes tratados.³³ Por outro lado, estes avanços permitiram dar resposta a determinadas patologias, nomeadamente às alterações neurológicas, pois como a barreira hematoencefálica (BHE) não permite que os fármacos alcancem o sistema

nervoso central (SNC) devido à presença de um grande número de transportadores de efluxo, a implantação de bombas programáveis de influxo possibilitou contornar esse obstáculo pelo fornecimento dos fármacos nas doses adequadas. Outra grande inovação que despontou nesta área foi a estimulação cerebral profunda (ECP) para o tratamento de doenças degenerativas, como a doença de Parkinson. Este tratamento consiste na aplicação de estímulos elétricos por intermédio de um fino eletrodo que é inserido no local alvo do cérebro, sendo responsável pelo desaparecimento dos sintomas mais comuns, como a bradicinesia, os tremores descontrolados e a rigidez. Importa ainda sublinhar o potencial que os polímeros naturais e sintéticos têm demonstrado na prática clínica. Por exemplo, o polimetilmetacrilato surgiu como um inovador material para o fabrico das lentes de contacto e o politetrafluoroetileno (PTFE) na reconstrução de sistemas vasculares e tecidos moles.^{27,32,34} Estas inovações têm sido fundamentais no sentido de promover novas abordagens e o aperfeiçoamento das preexistentes, contribuindo para uma melhoria contínua das potencialidades do sector clínico à disposição da sociedade humana.

2.3. Classificação dos biomateriais

A diversidade de aplicações que os biomateriais e dispositivos médicos oferecem está associada não só à sua origem, como às suas propriedades individuais e cruzadas, assim como ao género de interface que é estabelecido entre o biomaterial e o tecido hospedeiro. De acordo com a sua origem os biomateriais podem ser classificados como naturais, sintéticos e semissintéticos ou híbridos. Os biomateriais naturais são provenientes de fontes animais e vegetais, e correspondem ao conjunto de biomateriais que mais eficientemente mimetizam os fenómenos biológicos. Por sua vez, os biomateriais sintéticos incluem os metais e suas ligas, polímeros, cerâmicas e compósitos. Os materiais metálicos são considerados os menos biocompatíveis e os mais suscetíveis de sofrer corrosão pelo contacto a longo termo com os sistemas biológicos, e cujos efeitos sistémicos dos produtos de degradação desses metais e suas ligas tem despertado a atenção da comunidade científica. Os materiais poliméricos se caracterizam pelas baixas densidades, elevada ductilidade, boa compatibilidade e, ao contrário do que acontece com os materiais metálicos não se verificam reações de corrosão no contacto com os sistemas biológicos, sendo adequados à substituição de tecidos moles no corpo humano. Os materiais cerâmicos possuem densidades moderadas, elevada biocompatibilidade e boa resistência à compressão, sendo por isso utilizados na substituição de tecidos duros (como pequenos ossos e dentes) e no revestimento de implantes metálicos de forma a proteger esse material da progressiva corrosão quando submetidos ao contacto íntimo e prolongado com os sistemas biológicos. Os materiais compósitos são essencialmente caracterizados pela

sua elevada biocompatibilidade, resistência à corrosão e considerável resistência à tração. Estes compósitos resultam da conjugação de pelo menos dois tipos de materiais distintos, nomeadamente os metais e cerâmicas, metais e polímeros, ou cerâmicas e polímeros. Por último, os biomateriais semissintéticos ou híbridos surgem da necessidade de obter novos materiais cujas propriedades não se encontram nos materiais convencionais, e são preparados pela combinação de componentes orgânicos e inorgânicos. De um modo geral, as propriedades individuais de cada componente são complementares, porém a conjugação de ambos origina um único material homogêneo com propriedades distintas daquelas que lhe deram origem. Ocasionalmente os conceitos “compósito” e “híbrido” são referidos na literatura como sinónimos, mas estes diferem entre si nas dimensões e na dispersão dos seus componentes, além de que os compósitos não requerem uma mistura obrigatória entre os componentes orgânicos e inorgânicos.^{27,34,35}

No contexto das aplicações biomédicas os biomateriais podem ser classificados como biotoleráveis, bioinertes, bioativos e biodegradáveis ou reabsorvíveis, de acordo com o tipo de interface que estabelecem com os sistemas biológicos. Os materiais biotoleráveis representam um conjunto de materiais que apenas são tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes pela formação de uma camada envolvente de tecido fibroso que surge na sequência da libertação de resíduos pelo biomaterial. Neste conjunto de materiais se incluem praticamente todos os polímeros sintéticos e a maioria dos metais e suas ligas. Por sua vez, os materiais bioinertes constituem um conjunto de materiais igualmente tolerados pelo organismo, mas cuja camada envolvente de tecido fibroso formada é normalmente de pequena espessura. Quanto menor for a quantidade de resíduos libertados pelo biomaterial, menor será a espessura da camada de tecido fibroso formada e mais tolerável o biomaterial se torna relativamente aos tecidos do hospedeiro, e vice-versa. Do conjunto de materiais bioinertes mais utilizados se destacam a zircônia (dióxido de zircónio), a alumina (óxido de alumínio), o titânio e suas ligas, e o carbono. Os materiais bioativos compreendem todos os materiais que promovem a diferenciação e proliferação celulares ao nível do tecido ósseo (osteocondutividade). Habitualmente os compostos à base de fosfatos de cálcio são bons exemplos de materiais bioativos, como os vidros e vitrocerâmicas, e a hidroxiapatite. Por último, os materiais biodegradáveis ou reabsorvíveis incluem todos os materiais que após um determinado período de tempo em contacto com os tecidos são gradualmente degradados, solubilizados ou até fagocitados pelo organismo.²⁷ Além disso os seus produtos de degradação não são tóxicos, aspeto que viabiliza o desenvolvimento de abordagens terapêuticas temporárias, como por exemplo os *stents* farmacológicos biodegradáveis que revelam em certos casos um melhor desempenho face aos *stents* metálicos.³⁶

2.4. Avaliação biológica dos dispositivos médicos

No sentido de assegurar a *performance* dos biomateriais e dispositivos médicos utilizados na biomedicina, torna-se indispensável efetuar uma prévia e minuciosa avaliação da sua biocompatibilidade. Esta avaliação consiste em averiguar se o material é compatível com os tecidos biológicos, e de modo a obter essa apreciação um conjunto de testes *in vitro* e *in vivo* são realizados em laboratório para concluir se o material possui as características e propriedades adequadas que o tornam num potencial biomaterial de interesse clínico.

A avaliação da biocompatibilidade de biomateriais e dispositivos médicos constitui um dos requisitos recomendados pelo conjunto de normas da *International Organization for Standardization* (ISO), nomeadamente a ISO 10993 – *Biological Evaluation of Medical Devices*.³⁷ De acordo com a norma ISO 10993 os estudos de citotoxicidade *in vitro* constituem a primeira linha de testes para avaliar a biocompatibilidade de qualquer biomaterial e dispositivo médico na sua forma acabada e, uma vez provada a sua atoxicidade o estudo da biocompatibilidade poder-se-á realizar *in vivo* com modelos animais de laboratório. O estudo da citotoxicidade baseia-se no contacto direto ou indireto entre o material em análise e diferentes culturas celulares de mamíferos, através das quais se detetam as alterações celulares decorrentes dessas exposições. Além dos testes de citotoxicidade a norma ISO 10993 refere outras categorias de testes que também permitem avaliar a biocompatibilidade dos biomateriais e dispositivos médicos, nomeadamente os ensaios de genotoxicidade/mutagenicidade, hematológicos, implantação, reatividade, pirogénicos, sensibilização, toxicidade subaguda/subcrónica, toxicidade sistémica (aguda) e toxicidade crónica (carcinogenicidade). Contudo, estas categorias de testes não são todas aplicadas a qualquer que seja o biomaterial e dispositivo médico em análise. A escolha do número e tipo de testes a realizar encontra-se diretamente relacionada com dois parâmetros fundamentais, o tipo de contacto com o organismo e sua duração. Quanto ao tipo de contacto os biomateriais e dispositivos médicos podem ser aplicados diretamente sobre a superfície corpórea, ou numa via de comunicação externa (por exemplo nos equipamentos de hemodiálise), ou simplesmente implantados. Por sua vez, a duração do contacto poderá ocorrer por um período de tempo limitado (≤ 24 horas), prolongado (> 24 horas e ≤ 30 dias) ou permanente (> 30 dias). De acordo com estes parâmetros há testes que são realizados em detrimento de outros, tal como se sucede com os biomateriais e dispositivos médicos que foram concebidos para contactar de forma íntima e continuada com o sangue, os quais requerem uma avaliação por testes hematológicos (hemocompatibilidade).³⁷⁻³⁹ A norma ISO 10993 contempla uma secção

somente dedicada à avaliação da hemocompatibilidade *in vitro* dos biomateriais e dispositivos médicos, a ISO 10993-4 – *Selection of tests for interactions with blood – part 4*. Esta norma encontra-se dividida em 5 parâmetros distintos de avaliação, nomeadamente a adesão plaquetária e trombogenicidade, ativação da cascata de coagulação e do sistema complemento, e hematologia. Todavia, esta norma não padroniza os protocolos de avaliação dos parâmetros mencionados, sendo para isso necessário que cada laboratório de ensaios não-clínicos e grupos de investigação estabeleçam os seus próprios critérios de padronização e de validação.⁴⁰

3. Hidroxiapatite

Recentemente a investigação biomédica tem sido direcionada no sentido de identificar potenciais materiais com características biomiméticas, ou seja, com capacidade para mimetizar os fenómenos biológicos. De um modo geral, os biomateriais naturais possuem melhor biocompatibilidade do que os biomateriais sintéticos, dadas as suas características biomiméticas. Esta é a razão pela qual tem havido ao longo do tempo uma crescente sensibilização para a exploração dos materiais naturais, de modo a desenvolver novos biomateriais que promovam melhor qualidade de vida aos doentes tratados.⁴¹

3.1. Caracterização do biomaterial

A hidroxiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ – HAp) é um material biocerâmico que pertence à classe dos compostos de fosfato de cálcio e é provavelmente o mais importante fosfato de cálcio da sua classe. Além disso, é o principal componente do tecido mineral ósseo ao representar cerca de 43% da composição mineral óssea nos humanos, cerca de 65-70% da composição mineral óssea nos animais superiores (outros mamíferos e vertebrados) e cerca de 60-70% da composição mineral óssea nos peixes. Estes valores correspondem a aproximações, visto que há variações consoante a espécie animal ou o tipo de osso considerado, bem como ao longo da vida devido às sucessivas renovações do tecido mineral ósseo pelo constante balanço entre as atividades osteoblásticas (de síntese) e osteoclásticas (de degradação).⁴²⁻⁴³ A restante composição óssea é essencialmente constituída por matéria orgânica, da qual se destaca o colagénio que desempenha um papel crucial na atividade osteoblástica. A HAp é geralmente utilizada em diversas aplicações biomédicas de substituição de tecidos duros, como pequenos ossos e dentes, e no revestimento de implantes metálicos atendendo à sua elevada e reconhecida biocompatibilidade, bioatividade e biodegradabilidade. Importa ainda salientar que em muitas aplicações de substituição óssea a HAp é frequentemente combinada com outros

compostos de fosfato de cálcio, como por exemplo o fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - FTC) que embora revele menor bioatividade possui excelentes condições de biocompatibilidade e resorbabilidade. Este último refere-se à capacidade com que o biomaterial assimila os minerais necessários de modo a promover a proliferação do tecido ósseo.⁴⁴⁻⁴⁶

A diversidade na composição química dos diferentes materiais à base de fosfato de cálcio surge em resultado da incorporação de elementos comuns do organismo. Este aspeto condiciona de forma direta a *performance* dos materiais e determina as suas possíveis aplicações. Por exemplo, a substituição dos grupos hidroxilo (OH^-) na HAp por iões de cloro (Cl^-) ou de flúor (F^-) origina a Cloroapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$ - ClAp) e a Fluoroapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ - FAp), respetivamente. Embora estruturalmente semelhantes diferem no halogénio incorporado e consequentemente em algumas das suas propriedades. A incorporação de Cl^- promove um aumento da bioatividade do material e, por sua vez, a incorporação de F^- estimula a proliferação dos osteoblastos sem ocorrência de reabsorção óssea.^{47,48} Outro aspeto relevante a salientar é que a ocorrência de modificações na composição química da HAp (natural) diminui ao longo da vida, e isso é constatado pela aproximação da sua estrutura química à respetiva estequiometria, ou seja, tornando-se cada vez mais cristalina. Deste modo as atividades de renovação ósseas (osteoblásticas e osteoclásticas) não se processam à mesma velocidade ao longo da vida, podendo se afirmar que um menor grau de cristalinidade da HAp corresponde a uma maior velocidade de degradação do tecido mineral ósseo e vice-versa. Atendendo a estes factos, a otimização dos materiais para uma velocidade de degradação adequada torna-se imprescindível, e isso é possível através de uma associação de fosfatos de cálcio cujas composições químicas sejam variáveis, ou seja, diferentes proporções nos elementos de cálcio (Ca) e fósforo (P) – Ca/P. Uma vez que a degradação dos fosfatos de cálcio diminui à medida que a proporção de Ca/P aumenta, então é expectável que o fosfato dicálcico (FDC) com uma proporção de Ca/P=1 se degrade mais rapidamente que o FTC com uma proporção de Ca/P=1,5 e, por sua vez, que este se degrade mais depressa do que a HAp com uma proporção de Ca/P=1,67.⁴⁹

Para que a HAp e outros fosfatos de cálcio possam ser utilizados nas diversas aplicações biomédicas pretendidas há outros aspetos a ter em consideração, como as suas propriedades mecânicas e o seu processo de síntese, ou seja, no estudo da dimensão e forma das partículas do material quando este é submetido a diferentes valores de temperatura de calcinação (processo de sinterização), mas sempre abaixo do valor de temperatura de fusão. A análise deste processo é fundamental pois possibilita averiguar

quais as melhores condições mecânicas para que o biomaterial seja preparado de modo a otimizar a sua eficiência.⁴⁵ Podem ser obtidos via síntese química através de diferentes métodos, sendo o mais comum a reação química entre os sais de Ca e P, a qual possibilita obter fosfatos de cálcio de diferentes estequiometrias consoante as proporções de Ca/P. Por outro lado, a HAp pode ser obtida a partir de algumas fontes naturais, nomeadamente em corais e conchas do mar, por conversão de um dos seus principais constituintes (carbonato de cálcio) em HAp. De um modo geral, os ossos dos animais superiores (mamíferos e vertebrados) e dos peixes são boas fontes de HAp, uma vez que estes o possuem naturalmente sem que haja a necessidade de os submeter a qualquer reação química de conversão, bastando somente realizar um processo de extração, quando aplicável.^{44,45,49}

Recentemente tem-se assistido a uma crescente consciencialização pela valorização dos resíduos e subprodutos com vista à obtenção de compostos de elevado valor acrescentado, uma vez que a produção destes resíduos e subprodutos tem aumentado de forma significativa ao longo do tempo e a rentabilização dos mesmos tem sido escassa. Por exemplo, no sector pesqueiro aproximadamente 50% do peso total da captura se destina a consumo humano, e os restantes 50% são considerados resíduos ou subprodutos para eliminação, dos quais se poderiam extrair diversos compostos de elevado valor acrescentado, nomeadamente aminoácidos, colagénio, enzimas, outras proteínas, HAp, entre outros.⁴⁴

3.2. Avaliação da hemocompatibilidade *in vitro* da HAp

Atendendo às orientações da norma ISO 10993-4 – *Selection of tests for interactions with blood – Part 4*, qualquer que seja o biomaterial ou dispositivo médico cuja aplicação biomédica implique o contacto íntimo e continuado com o sangue necessita de uma avaliação da sua hemocompatibilidade *in vitro*, tal como acontece com os compostos à base de HAp (Tabela 2).

Tabela 2 - Resumo das principais categorias de teste e respectivos métodos de avaliação da hemocompatibilidade *in vitro* de amostras de HAp

Categoria de Teste	Método	Tipo de Cultura	Fonte de HAp	Tipo de Amostra	Concentração (m/v)	Temperatura Calcinação (°C)	Período Incubação (h)	Resultado	Referência
Hematológicos	Teste de Hemólise (%)	EH	Espinhas de Bacalhau	Pó	0,2 g/mL	1100	3	< 2,0	45
						1200		< 2,0	
		EH	Síntese Química	Compósito	-	-	1	< 2,0	50
		EH	Síntese Química	Nanopartículas	250 µg/mL	-	1	≈ 6,0	51
					500 µg/mL			≈ 10,0	
					750 µg/mL			≈ 16,0	
					1000 µg/mL			≈ 19,0	
		EH	Síntese Química	Nanocompósito	20 mg/mL	500	1	< 2,0	52
					40 mg/mL				
					60 mg/mL				
					80 mg/mL				
					100 mg/mL				
		Er	Síntese Química	Nanopartículas	-	-	30 min 1	< 2,0	54
		EH	Síntese Química	Nanocompósito	25 µg/mL	-	1	< 2,0	55
					50 µg/mL				
					100 µg/mL				
					250 µg/mL				
Trombogenicidade	SEM	PRP	Síntese Química	Filme	-	-	1	Baixa Adesão	53

EH: Eritrócitos de humano; **Er:** Eritrócitos de ratinho; **HAp:** Hidroxiapatite; **PRP:** Plasma rico em plaquetas; **SEM:** *Scanning Electron Microscopy*

De acordo com os dados apresentados na Tabela 2, as principais categorias de testes usadas na avaliação da hemocompatibilidade *in vitro* dos compostos à base de HAp resumem-se aos testes Hematológicos e de Trombogenicidade. Nos hematológicos, o teste de hemólise permite avaliar a integridade dos eritrócitos após o contacto com o biomaterial ou dispositivo médico em análise. Em conformidade com a norma ASTM F756-00:2000 - *Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials from the American Society for Testing and Materials*, um resultado inferior a 2% no teste de hemólise significa que material não é considerado hemolítico, se for entre 2 e 5% o material é considerado relativamente hemolítico, mas se for superior a 5% o material é hemolítico. Na trombogenicidade, o ensaio de *Scanning Electron Microscopy* (SEM) possibilita observar a superfície dos materiais em estudo, além das plaquetas e sua morfologia. Consoante as características da superfície do material, as plaquetas alteram a sua conformação discóide para uma esférica projetando pseudópodes de comprimentos variáveis (plaqueta ativada). Quanto maior for a extensão de plaquetas ativadas presentes na superfície do material, mais este é considerado trombogénico.

3.3. Principais aplicações e perspectivas futuras

Atualmente a HAp é utilizada em numerosas aplicações biomédicas, nomeadamente na substituição de alguns tecidos duros em ortopedia e ortodontia, e no revestimento de implantes metálicos.^{44,45,56-58} Outra aplicação da HAp tira partido da sua capacidade para efetuar a descontaminação das águas residuais contendo corantes e metais pesados, uma vez que a sua estrutura química lhe permite ceder grupos hidroxilo (OH^-) e em consequência disso capturar os elementos iónicos indesejáveis nas águas residuais. Além disso a HAp tem sido frequentemente integrada em diversos compósitos poliméricos, pela associação de diferentes tipos de materiais, de modo a originar novos com características e propriedades adequadas para serem utilizados em novas abordagens.⁴² Recentemente, um estudo publicado demonstrou que um biomaterial à base de HAp e óxido de ferro (III) apresenta a capacidade para absorver a radiação ultravioleta, tendo sido desenvolvido um creme protetor solar com base nesse biomaterial de HAp contendo óxido de ferro (III). Atendendo à crescente consciencialização pela valorização dos resíduos e subprodutos de elevado valor acrescentado, é expectável que no futuro próximo novos biomateriais sejam descobertos ou aperfeiçoados, com o único propósito de contribuir para uma contínua melhoria da qualidade de vida da sociedade humana.

4. Quitosano

4.1. Caracterização do biomaterial

O quitosano (Qs) é um material de origem natural extensamente utilizado em diversas áreas, nomeadamente na indústria farmacêutica, agroalimentar, biomédica, cosmética, entre outras. Atendendo às suas distintas características biológicas e físico-químicas constitui um material bastante apelativo para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de biomateriais.^{41,60,61} É constituído por unidades de β -1,4-*N*-acetil-D-glucosamina (em menor extensão) e β -1,4-glucosamina (em maior extensão), sendo derivado da quitina e obtido por desacetilação parcial da mesma em meio alcalino (Figura 10). Por sua vez, a quitina é um polissacarídeo natural constituído por unidades de β -1,4-*N*-acetil-D-glucosamina (em elevada extensão) e que se pode encontrar no exoesqueleto de crustáceos, alguns moluscos e insetos, bem como nas paredes celulares de alguns fungos. Representa uma das mais importantes fontes de produção de Qs, além de ser considerado o polímero natural mais abundante da natureza depois da celulose.^{41,60,61}

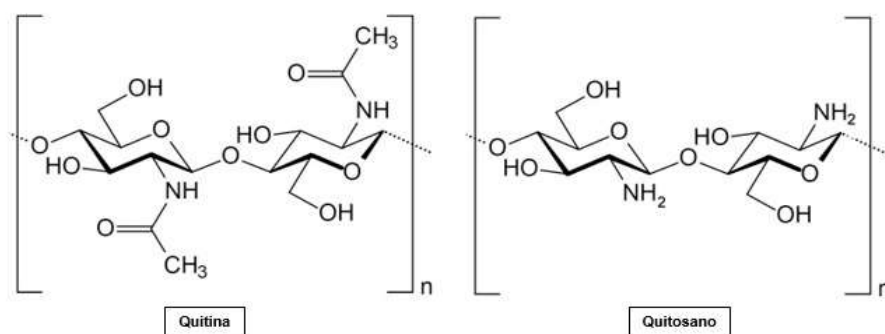


Figura 10 - Estrutura química dos polímeros naturais de Quitina e Quitosano (Qs). Adaptado de ⁶²

Estes polímeros naturais podem ser obtidos a partir de subprodutos da indústria agroalimentar e, dependendo da sua estrutura química e das estratégias de manipulação da mesma é possível que possa apresentar diversas propriedades, nomeadamente antiinflamatória, antioxidante, pró-coagulante, entre outras, permitindo um grande leque de aplicações.^{60,61} Os polímeros de quitina se distinguem dos de Qs pela proporção entre os monómeros de β -1,4-*N*-acetil-D-glucosamina e β -1,4-glucosamina presentes nas suas estruturas. Assim, o QS só é considerado como tal quando o polímero se tornar solúvel em soluções ácidas diluídas, ou seja, quando a proporção de monómeros de β -1,4-*N*-acetil-D-glucosamina na sua estrutura for inferior a 50-60%, sendo o grau de desacetilação do

polímero a fração correspondente às unidades desacetiladas (monómeros de β -1,4-glucosamina).⁴¹ O Qs apresenta essencialmente três grupos funcionais na sua estrutura, um grupo amina (NH_2) e dois grupos hidroxilo (OH^-) primário e secundário, os quais se localizam nas posições C-2, C-3 e C-6, respetivamente. Atendendo aos referidos grupos funcionais, a dissolução do Qs em soluções ácidas diluídas ($\text{pH} < 6,3$) é alcançada pela protonação dos grupos amina (NH_2) tornando o Qs num polímero policatiónico com capacidade para estabelecer ligações coesas a espécies carregadas negativamente. Esta dissolução em meio ácido depende de vários fatores, sendo os mais relevantes o grau de desacetilação e o peso molecular, que condicionam diretamente a viscosidade da solução final. Além disso, as modificações químicas realizadas nos grupos hidroxilo (OH^-) primário e secundário proporcionam uma maior diversidade na composição estrutural do polímero e, por conseguinte, em diferentes propriedades e aplicações.^{41,60,61}

4.2. Avaliação da hemocompatibilidade in vitro do Qs

Atendendo às orientações da norma ISO 10993-4 – *Selection of tests for interactions with blood – Part 4*, qualquer que seja o biomaterial ou dispositivo médico cuja aplicação biomédica implique o contacto íntimo e continuado com o sangue necessita de uma avaliação da sua hemocompatibilidade *in vitro*, tal como acontece com os compostos à base de Qs (Tabela 3).

Tabela 3 - Resumo das principais categorias de teste e respectivos métodos de avaliação da hemocompatibilidade *in vitro* de amostras de Qs

Categoria de Teste	Método	Tipo de Cultura	Tipo de Amostra	Desacetilação (%)	Peso Molecular	Concentração (m/v)	Período de Incubação	Resultado	Referência
Hematológicos	Teste de Hemólise (%)	ER	Hidrogel	85	-	50 µg/mL	6 h	< 3,5	63
						100 µg/mL			
						200 µg/mL			
		EC	Micela Polimérica	100	BPM	1000 a 0,1 µg/mL	1 h	< 2	64
		EC	Filme	99,2	APM	-	1 h	< 2	66
		EH	Enxerto	90	APM	-	1 h	< 2	67
		EH	Nanopartículas	≥ 75	BPM	0,05 mg/mL	3 h	< 3	69
Filme	-		-			-			
Trombogenicidade	SEM	PRP	Filme	99,2	APM	-	1 h	Baixa Adesão	66
		PRP	Copolímero	75-85	-	-	1 h	Baixa Adesão	65
		PRP	Enxerto	87	BPM	-	1 h	Baixa Adesão	68
		Sangue Total				-			
	PCST	Sangue Total	Filme	99,2	APM	-	5, 10, 20, 40; 60 min	Baixa Magnitude	66
Ativação da Cascata	TRP (min)	PPP	Copolímero	75-85	-	-	35 min	≈ 23	65
		PPP	Filme	99,2	APM	-	10 min	< 3	66
		PPP	Enxerto	90	APM	-	< 2 min	< 3	67
	TP (s)	PPP	Nanopartículas	≥ 75	BPM	0,05 mg/mL	3 h	≈ 14 (normal)	69
	TTPa (s)							≈ 32 (normal)	

APM: Alto peso molecular; **BPM:** Baixo peso molecular; **EC:** Eritrócitos de coelho; **EH:** Eritrócitos de humano; **ER:** Eritrócitos de ratazana; **PCST:** Perfil de coagulação do sangue total; **PPP:** Plasma pobre em plaquetas; **PRP:** Plasma rico em plaquetas; **SEM:** *Scanning Electron Microscopy*; **TP:** Tempo de protrombina; **TRP:** Tempo de recalcificação do plasma; **TTPa:** Tempo de tromboplastina parcial ativada

De acordo com os dados apresentados na Tabela 3, verifica-se que as principais categorias de testes usadas na avaliação da hemocompatibilidade *in vitro* dos compostos à base de Qs resumem-se aos testes Hematológicos, de Trombogenicidade e de Ativação da Cascata de Coagulação. Nos hematológicos e em conformidade com a norma ASTM F756-00:2000 - *Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials from the American Society for Testing and Materials*, o Qs revelou-se não hemolítico^{64,66,67} e relativamente hemolítico^{63,69} em alguns dos ensaios. Na trombogenicidade, o ensaio de SEM permitiu observar uma diminuição considerável da adesão plaquetária nas superfícies dos materiais contendo Qs na sua formulação.^{65,66,68} O estudo do perfil de coagulação do sangue total (PCST) é realizado para avaliar a magnitude de trombogenicidade do material ao longo de um período de tempo. Devido à presença do Qs na composição do material desenvolvido, os valores obtidos foram próximos do controlo negativo, ou seja, muito pouco trombogénico.⁶⁸ Na avaliação da coagulação sanguínea, o método do tempo de recalcificação do plasma (TRP) permite avaliar a influência que os materiais exercem no tempo de coagulação do plasma, sendo para isso registado o tempo ocorrido imediatamente após a adição de cálcio até ao aparecimento dos filamentos de fibrina. Nos casos apresentados, a incorporação de Qs nos materiais em estudo condicionou aumento da coagulação^{66,67} e uma diminuição da coagulação⁶⁵. Os métodos do tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) permitem avaliar a influência os materiais exercem sobre as vias extrínseca e intrínseca da cascata da coagulação, respetivamente. De acordo com os dados registados, os valores obtidos estão no intervalo de valores de referência do equipamento utilizado e do controlo negativo, não afetando de forma significativa nenhuma das vias da cascata da coagulação.⁶⁹

De um modo geral, o Qs revela ser um biomaterial não hemolítico, não trombogénico e, por isso, hemocompatível.

4.3. Principais aplicações e perspetivas futuras

A multiplicidade de aplicações que o Qs e seus derivados oferecem é muito vasta e abrange inúmeras áreas de intervenção (Tabela 4). As propriedades biológicas e físico-químicas que apresenta, nomeadamente biocompatibilidade, hemocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade, entre outras, constituem as condições favoráveis para que este biomaterial seja tão utilizado e tão extensivamente estudado em busca de novas abordagens. Além disso, e devido às modificações que se podem efetuar nos grupos funcionais hidroxilo e nas ligações que se podem estabelecer com o grupo funcional amina, é expectável que no futuro haja uma contínua aposta na manipulação da sua estrutura com

vista em obter novos compostos de elevado valor acrescentado. Tendo em conta que o Qs é obtido por desacetilação parcial da quitina e esta, por sua vez, se encontra presente em vários elementos marinhos, é também esperado que haja um maior reaproveitamento dos resíduos e subprodutos dessas fontes naturais junto das indústrias agroalimentares.

Tabela 4 - Principais aplicações da quitina, Qs e seus derivados. Adaptado de ⁴¹

Área de Intervenção	Exemplos de Aplicações
Nutrição	Fibra dietética
	Redução de absorção de lípidos
	Agente antiácido
	Ingrediente de alimentação infantil
	Efeito hipocolesterolémico
Agente Antimicrobiano	Bactericida
	Fungicida
	Indicador de contaminação por fungos
Farmacêutico	Agente cicatrizante
	Veículo de transporte de fármacos
	Medicina regenerativa (osso, pele, fígado e cartilagem)
	Hemostático
Filmes Biodegradáveis	Controlo da frequência respiratória
	Agente antimicrobiana de libertação controlada
	Antioxidante de libertação controlada
	Redução da pressão parcial de oxigénio
	Controlo da temperatura
	Controlo na transferência da humidade
Descontaminação da Água	Remoção de corantes
	Recuperação de pesticidas, fenóis e outros

Parte II

Objetivos

Atualmente os biomateriais são utilizados num inestimável número de aplicações biomédicas, contribuindo de forma inequívoca para a redução da morbidade e mortalidade da população. Além disso, como a crescente expectativa de vida da população está também associada a um aumento do número de doenças crónicas não transmissíveis e ao agravamento das doenças preexistentes, torna-se imprescindível que a investigação e o desenvolvimento de novos biomateriais possam acompanhar essa progressão tanto quanto possível ao longo do tempo, de modo a minimizar o impacto das mesmas e melhorando a qualidade de vida da população. Recentemente a investigação de novos biomateriais tem sido gradualmente direcionada para os que possuem propriedades biomiméticas, dos quais os biomateriais naturais se destacam nas avaliações *in vitro* e *in vivo* de biocompatibilidade e hemocompatibilidade por serem aqueles que mais eficientemente mimetizam os fenómenos biológicos. A HAp e o Qs são exemplos de biomateriais naturais com atual reconhecimento pelas suas diversas aplicações na biomedicina, e devido às suas características e propriedades têm sido continuamente estudados com vista a descoberta de novas aplicações com interesse clínico. Nas aplicações biomédicas em que se pretenda o contacto íntimo e continuado com o sangue é necessário proceder a uma prévia e minuciosa avaliação das propriedades hemolíticas e hemostáticas dos biomateriais ou dispositivos médicos na sua forma acabada, em relação às quais há na literatura pouca informação e cujos resultados nem sempre encontram-se em concordância.

Tendo em consideração os vários aspetos acima mencionados, os objetivos deste trabalho foram caracterizar e comparar o potencial de diferentes compostos à base de HAp e Qs de origem natural como possíveis biomateriais com interesse para uso clínico, através da avaliação das suas propriedades hemolíticas e hemostáticas com modelos laboratoriais *in vitro* em conformidade com as *guidelines* da norma ISO 10993 – *Biological Evaluation of Medical Devices*.

Parte III

Materiais e Métodos

1. Preparação e caracterização das amostras

Com vista a realização do estudo *in vitro* de hemocompatibilidade foram preparados vários compostos à base de HAp e Qs de origem natural:

Uma considerável quantidade (~ 80 g) de espinhas de Bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) foram lavadas em água quente e quebradas manualmente em pedaços grandes com cerca de 1 cm de largura e comprimento. Em seguida, as espinhas foram secadas em estufa e submetidas a um pré-tratamento numa solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) durante 16 h a 50°C, de modo a enriquecer o seu conteúdo em cálcio. Esta etapa foi realizada numa *hotte* devido à muito provável libertação de vapores irritantes. A concentração de CaCl_2 foi 5 vezes superior ao conteúdo presente na HAp das espinhas, a qual foi estimada em cerca de 70% do seu peso. Após o período de incubação as espinhas foram secadas em estufa e, posteriormente, calcinadas a diferentes valores de temperatura, nomeadamente a 900°C, 1000°C, 1100°C e 1200°C, utilizando uma mufla (Nabertherm®, Germany) com uma taxa de aquecimento/arrefecimento programada em 5°C/min e um período de permanência de 1 h. As amostras calcinadas foram esmagadas e trituradas em pó num almofariz de porcelana e respetivo pilão, sendo utilizados sem qualquer tratamento adicional, enquanto que em outros casos os pós foram prensados sob a forma de pastilha em formato de disco, com um diâmetro de 13 mm e submetidos a uma pressão uniaxial de ~ 1,5 toneladas por auxílio de uma prensa hidráulica de laboratório (Specac®, United Kingdom). As pastilhas de HAp foram calcinadas a 700°C sob as mesmas condições em que as espinhas foram inicialmente calcinadas, ou seja, à mesma taxa de aquecimento/arrefecimento de 5°C/min e com um período de permanência de 1 h. Para além das amostras de HAp obtidas a partir das espinhas de Bacalhau do Atlântico foram também adquiridas duas amostras comerciais distintas de HAp, nomeadamente a NeoBone® (Ceramed®, Loures, Portugal) sob a forma de grânulos esféricos de diâmetro variável entre 500 e 1000 µm, e a CAPTAL® (Plasma Biotall Limited®, Buxton, United Kingdom) sob a forma de pó de diâmetro variável entre 2 e 4 µm. Uma fração destas amostras comerciais foi utilizada sem qualquer tratamento adicional, enquanto que em outros casos os grânulos da NeoBone® e os pós da CAPTAL® foram prensados sob a forma de pastilha em formato de disco e calcinados a 700°C, nas mesmas condições em que as anteriores amostras de HAp foram preparadas.

As amostras de Qs foram preparadas com base em Qs de alto peso molecular (QsAPM, ~ 624 kDa, desacetilação > 75%) e Qs de baixo peso molecular (QsBPM, ~ 107 kDa, desacetilação entre 75-85%) adquiridos à Sigma-Aldrich® (St Louis, MO, USA) sob a

forma de pó e, aproximadamente, cerca de 1 g de cada amostra comercial foi pesada e separada para frascos de vidro com rosca individualizados e devidamente identificados. Seguidamente foram preparadas 3 soluções de ácido acético 1% (v/v) de 50mL, a partir da diluição de 500 µL de uma solução de ácido acético glacial (Panreac®, 99,5%) em 49,5 mL de água destilada. Esta etapa foi realizada numa *hotte* devido ao risco acrescido de libertação de fortes vapores irritantes. Os diferentes pós de Qs anteriormente pesados foram dissolvidos cada um numa solução de ácido acético 1% (v/v) de forma lenta e com agitação manual para evitar a formação de flocos indesejáveis que dificultam a sua posterior homogeneização, obtendo-se as soluções de QsAPM e QsBPM 2% em ácido acético (m/v). De modo a homogeneizar as soluções até que estas adquiram a viscosidade apropriada, foi adicionada uma barra magnética a cada frasco de vidro com rosca e ambos colocados sobre dispositivos combinados de agitação/aquecimento a 50°C. Enquanto a solução de QsAPM 2% (m/v) esteve em contínua agitação/aquecimento a 50°C por mais de 72 h e revelando um grande teor de viscosidade, a solução de QsBPM 2% (m/v) esteve cerca de 6 h em agitação/aquecimento a 50°C e apresentando um baixo teor de viscosidade. A partir de cada solução de Qs, várias diluições decimais sucessivas e de concentrações conhecidas foram preparadas, nomeadamente a 1mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,01 mg/mL e 0,001 mg/mL. A terceira solução de ácido acético 1% (v/v) de pH = 2,73 foi utilizada como branco para verificar a influência que a matriz das soluções de QsAPM e QsBPM apresenta ao longo do estudo de hemocompatibilidade.

2. Avaliação *in vitro* da hemocompatibilidade

De forma a realizar o teste de hemólise e os estudos hemostáticos aos biomateriais previamente preparados, amostras de sangue total foram obtidas de 3 voluntários saudáveis por punção venosa para tubos de 3,5 mL contendo citrato de sódio a 3,2% como agente anticoagulante (Vacuette®, Austria). Em alguns casos, o sangue total foi centrifugado a 300 g durante 15 min a 4°C para obter o plasma rico em plaquetas (PRP) ou a 2000 g durante 15 min a 4°C para obter o plasma pobre em plaquetas (PPP).

2.1. Estudo das propriedades hemolíticas

2.1.1. Teste de hemólise

O teste de hemólise foi efetuado em conformidade com a norma ASTM F756-00:2000 - *Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials from the*

American Society for Testing and Materials, na qual um resultado inferior a 2% significa que o material não é considerado hemolítico, entre 2% e 5% o material é considerado relativamente hemolítico, e superior a 5% o material é hemolítico. Após colheita das amostras de sangue total, a concentração de hemoglobina foi determinada num contador de células automatizado (Sysmex® K1000). Em seguida, o sangue total foi diluído com uma solução tampão de fosfato salino (PBS, pH = 7,4) para obter uma concentração de hemoglobina de 8 g/dL. Neste teste apenas as amostras de HAp sob a forma de pastilha e de pó calcinados entre 900°C e 1200°C foram avaliados, e à concentração de 0,2 g/mL. Todas as amostras foram incubadas em banho-maria (Memmert®, Germany) numa suspensão eritrocitária durante 3 h a 37°C e sob suave agitação a cada 60 min. Após o período de incubação as amostras foram homogeneizadas e 50 µL de cada suspensão foram adicionadas a 950 µL de PBS (controlo negativo) e a 950 µL de água destilada (controlo positivo) presentes em tubos de hemólise. Seguidamente, todos os tubos de hemólise foram centrifugados a 1600 g durante 7 min a 4°C, e do sobrenadante foram recolhidos 200 µL para uma placa de ELISA devidamente identificada para uma análise espectrofotométrica ao comprimento de onda de 540 nm, sendo este o comprimento de onda de máxima absorção da hemoglobina (BioTek® PowerWave™ XS).

A percentagem de hemólise foi determinada dividindo a absorvência obtida no tubo com PBS (A_{PBS}) pela absorvência obtida no tubo com água destilada (A_{AD}) e multiplicando por 100, % de hemólise = $(A_{\text{PBS}} / A_{\text{AD}}) * 100$.

2.2. Estudo das propriedades hemostáticas

2.2.1. Hemostase primária

2.2.1.1. Scanning Electron Microscopy

A análise por SEM foi realizada para visualizar a superfície dos biomateriais, bem como a adesão das plaquetas e as modificações da sua morfologia. Este ensaio foi realizado em triplicado a todas as pastilhas de HAp, ao politetrafluoroetileno (PTFE, controlo negativo) e ao vidro (controlo positivo). Todas as amostras e controlos foram incubados em banho-maria (Memmert®, Alemanha) numa suspensão de 400 µL de PRP durante 3 h a 37°C e sob ligeira e contínua agitação. Após o período de incubação, as amostras e controlos foram cuidadosamente e extensivamente lavadas com PBS para remover o plasma em excesso e as plaquetas que não aderiram fortemente à superfície dos biomateriais. Em seguida, as plaquetas presentes à superfície dos biomateriais foram

fixadas com uma solução de glutaraldeído 1,5% (v/v) (Sigma-Aldrich®) durante uma incubação ao longo de 1 h no frigorífico (2°C-8°C), após a qual se procedeu a uma nova lavagem para remover todo o excesso da solução de glutaraldeído 1,5% (v/v). Atendendo aos riscos inerentes da sua manipulação, este reagente foi utilizado numa *hotte* durante a preparação da fixação dos biomateriais e nas várias lavagens efetuadas. Seguidamente, os biomateriais foram desidratados duas vezes por cada concentração de etanol (Panreac®, 99,8%) de uma série de graduações sucessivas preparadas, nomeadamente a 50%, 70%, 90% e 100%, e durante períodos de incubação de 15 min cada. Por último, as amostras e controlos foram revestidos por uma camada de ouro (Fisons Instruments, Sputter Coater SC502, United Kingdom) e observados por SEM (Leica Cambridge S-360, United Kingdom).

2.2.1.2. Quantificação da ativação plaquetária

De modo a quantificar a ativação plaquetária, este ensaio foi realizado em triplicado a todas as pastilhas e pós de HAp à concentração de 0,2 g/mL, como a todas as diluições das soluções de QsAPM e QsBPM, ao branco (pH = 2,73), ao PTFE (controlo negativo) e vidro (controlo positivo). Todas as amostras e controlos foram incubados em banho-maria (Memmert®, Germany) numa suspensão de 400 µL de PRP (exceto nas diluições de Qs que foi de 380 µL) durante 2 h a 37°C e sob ligeira e contínua agitação. Após o período de incubação cerca de 100 µL de cada suspensão foram removidos e diluídos em 400 µL de PBS presentes em tubos de hemólise previamente identificados. Em seguida, foram adicionados 5 µL de cada um dos anticorpos CD42a/GP9 (Thermo Scientific™, Illinois) e CD62P/P-seletina (Biolegend®, San Diego), e imediatamente incubados durante 15 min no escuro à temperatura ambiente. O primeiro anticorpo é específico para a ligação e identificação das plaquetas presentes na suspensão e o segundo específico para as plaquetas que se encontram ativadas. Terminado o período de incubação, as diferentes amostras foram analisadas por citometria de fluxo (BD Accuri™ C6, BD Biosciences, California), através da qual as plaquetas foram identificadas pela dispersão frontal e lateral de sinais, e onde cerca de 15000 eventos específicos das plaquetas foram avaliados quanto à sua intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias).

2.2.2. Hemostase secundária

2.2.2.1. Teste do TTPa e TP

No sentido de compreender o efeito que os biomateriais exercem nas vias intrínseca e extrínseca da cascata da coagulação, o TTPa e o TP foram realizados. Esta avaliação

foi efetuada em triplicado para todas as pastilhas e pós de HAp à concentração de 0,2 g/mL, a todas as diluições das soluções de QsAPM e QsBPM, ao branco (pH = 2,73), ao PTFE (controlo negativo) e vidro (controlo positivo). Todas as amostras e controlos foram incubados em banho-maria (Memmert®, Alemanha) numa suspensão de 400 µL de PPP (exceto nas diluições de Qs que foi de 380 µL) durante 2 h e 30 min a 37°C, em agitação ligeira e contínua. Após o período de incubação, as suspensões de todas as amostras e controlos foram removidas e acondicionadas em tubos *ependorf* para serem congeladas a -80°C numa arca frigorífica até à realização da leitura dos resultados. Os valores dos tempos de TTPa e TP foram mais tarde determinados por intermédio do uso de reagentes comerciais (TECO® Medical Instruments GmbH, Neufahrn, Germany) e os resultados apresentados em segundos.

2.2.2.2. Tempo de coagulação do sangue total

A trombogenicidade dos biomateriais foi averiguada através da cinética da coagulação do sangue total, como previamente descrito por Frydrychowicz.⁷⁰ Resumidamente, este teste foi realizado em triplicado para todas as pastilhas e pós de HAp à concentração de 0,2 g/mL, a todas as diluições das soluções de QsAPM e QsBPM, ao branco (pH = 2,73), ao PTFE (controlo negativo) e vidro (controlo positivo). Todas as amostras e controlos foram incubados com 100 µL de sangue, previamente ativado com uma solução de CaCl₂ (0,1 M), ao longo de diferentes períodos de tempo, nomeadamente 5, 15, 25, 35 e 45 min. Ao fim de cada um destes períodos de incubação foram adicionados 3 mL de água destilada de forma a provocar a lise total dos eritrócitos que não ficaram aprisionados no interior dos coágulos formados, e incubado por mais 5 min. Finalizado cada um destes períodos de incubação, cerca de 200 µL de cada suspensão foram adicionados em placas de ELISA devidamente identificadas para uma análise espectrofotométrica ao comprimento de onda de 540 nm (BioTek® PowerWave™ XS).

2.2.2.3. Tempo de recalcificação do plasma

O método utilizado para avaliar o tempo de recalcificação do plasma foi previamente descrito por Motlagh.⁷¹ Esta análise foi realizada em triplicado a todos os pós de HAp à concentração de 0,05 mg/mL, a todas as diluições das soluções de QsAPM e QsBPM, ao branco (pH = 2,73) e ao controlo constituído por PPP com adição de CaCl₂ (controlo positivo). Após a adição de 100 µL de PPP a cada amostra e controlo foram adicionados 100 µL de CaCl₂ (0,0025 M) aos mesmos poços da placa de ELISA onde se encontram as amostras e controlos, imediatamente antes da análise espectrofotométrica ao comprimento

de onda de 405 nm, tendo sido efetuado um registo dos valores obtidos a cada 30 segundos durante 45 min e à temperatura de 37°C (BioTek® PowerWave™ XS).

3. Análise estatística

Os resultados encontram-se apresentados como média \pm *standard error of the mean* (S.E.M.). Na comparação de medianas foi utilizado o teste U de Mann-Whitney. Foi considerado como significativo um $p < 0,05$.

Parte IV

Resultados

1. Avaliação *in vitro* da hemocompatibilidade

1.1. Estudo das propriedades hemolíticas

1.1.1. Teste de hemólise

De acordo com os resultados obtidos no teste de hemólise (Figura 11) os pós de HAp revelaram ser, de um modo geral, menos hemolíticos do que as pastilhas de HAp. Também se verificou que as pastilhas e pós calcinados a 900°C e as pastilhas calcinadas a 1000°C eram hemolíticas (% de hemólise > 5%), que os pós calcinados a 1000°C eram relativamente hemolíticos (% de hemólise situada entre 2% e 5%) e que as pastilhas e pós calcinados a 1100°C e 1200°C não eram hemolíticos (% de hemólise < 2%). Além disso é possível verificar que o aumento da temperatura de calcinação diminui a percentagem de hemólise em ambas as formas de apresentação da HAp.

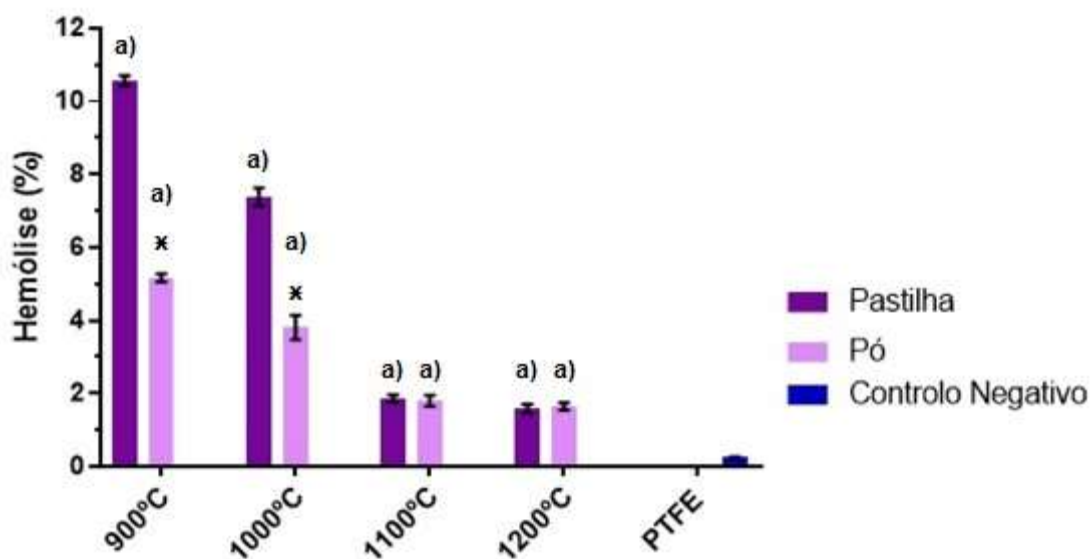


Figura 11 – Atividade hemolítica (%) das amostras de HAp apresentadas sob a forma de pastilha e pó, calcinadas entre 900°C e 1200°C. Os dados encontram-se apresentados como média \pm S.E.M. (*standard error of the mean*). x $p < 0,05$ vs pastilhas de HAp; a) $p < 0,05$ vs controlo negativo (PTFE)

1.2. Estudo das propriedades hemostáticas

1.2.1. Hemostase primária

A adesão e ativação das plaquetas visualizadas por SEM e quantificadas por citometria de fluxo revelaram que as pastilhas de HAp calcinadas a 1000°C e 1200°C, e os pós de HAp calcinados a 1000°C apresentaram maior % de plaquetas ativadas em comparação com as restantes temperaturas em estudo e ao PTFE (Figuras 12, 13 e 14).

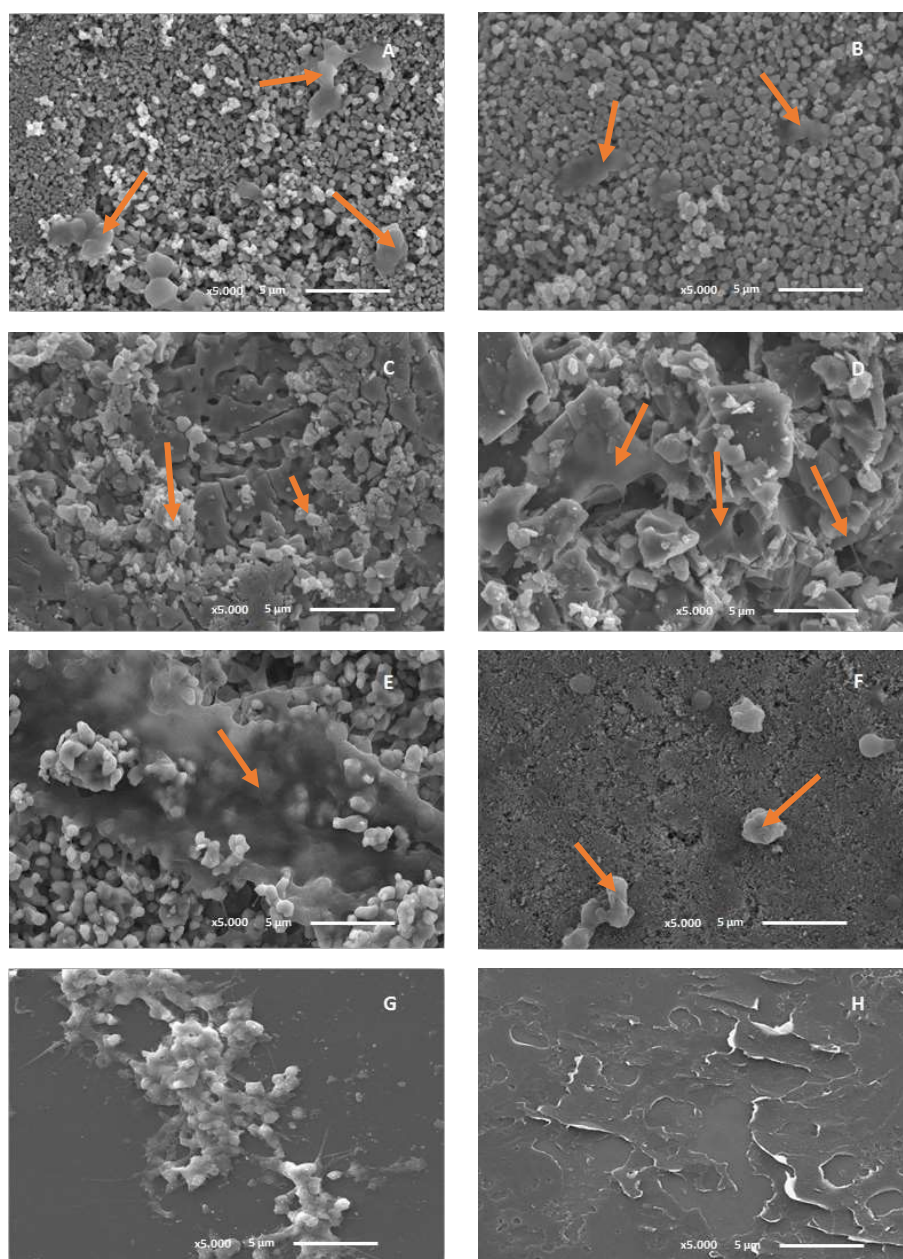


Figura 12 – Imagens de SEM retiradas à superfície das pastilhas de HAp calcinadas a 900°C (A), 1000°C (B), 1100°C (C) e 1200°C (D), às pastilhas NeoBone® (E), às pastilhas CAPITAL® (F), ao PTFE (G) e ao Vidro (H), para visualização da adesão e ativação plaquetárias, → localização das plaquetas

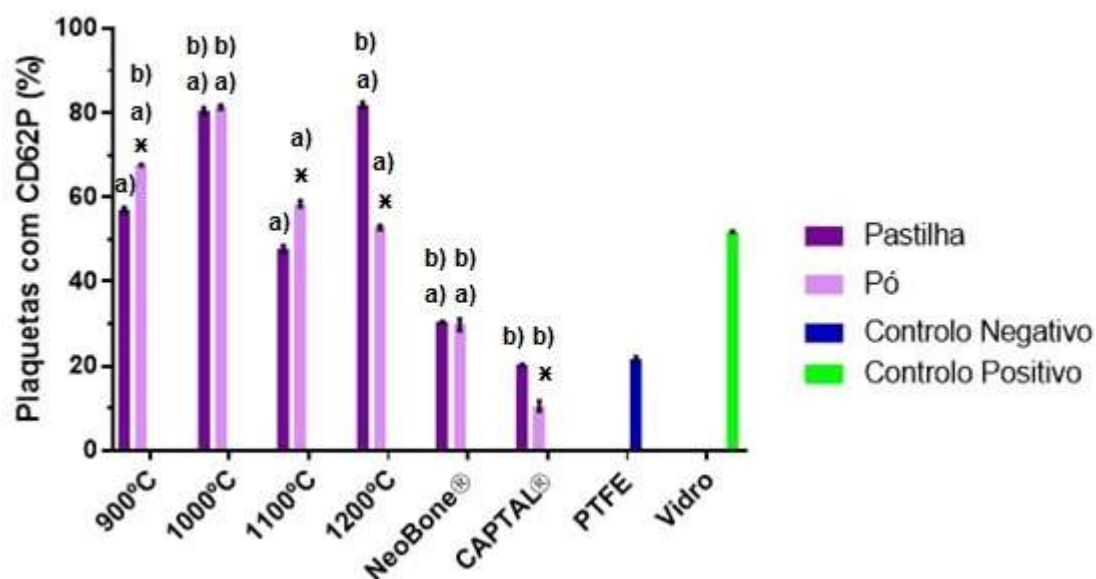


Figura 13 – Comparação do efeito induzido pelas pastilhas e pós de HAp calcinados a diferentes temperaturas, pelo controlo negativo (PTFE) e controlo positivo (Vidro) na ativação das plaquetas, atendendo à % de plaquetas marcadas positivamente com CD62P/P-seletina. Os dados encontram-se apresentados como média \pm S.E.M. (*standard error of the mean*). * $p < 0,05$ vs pastilhas de HAp; a) $p < 0,05$ vs controlo negativo (PTFE) e b) $p < 0,05$ vs controlo positivo (Vidro)

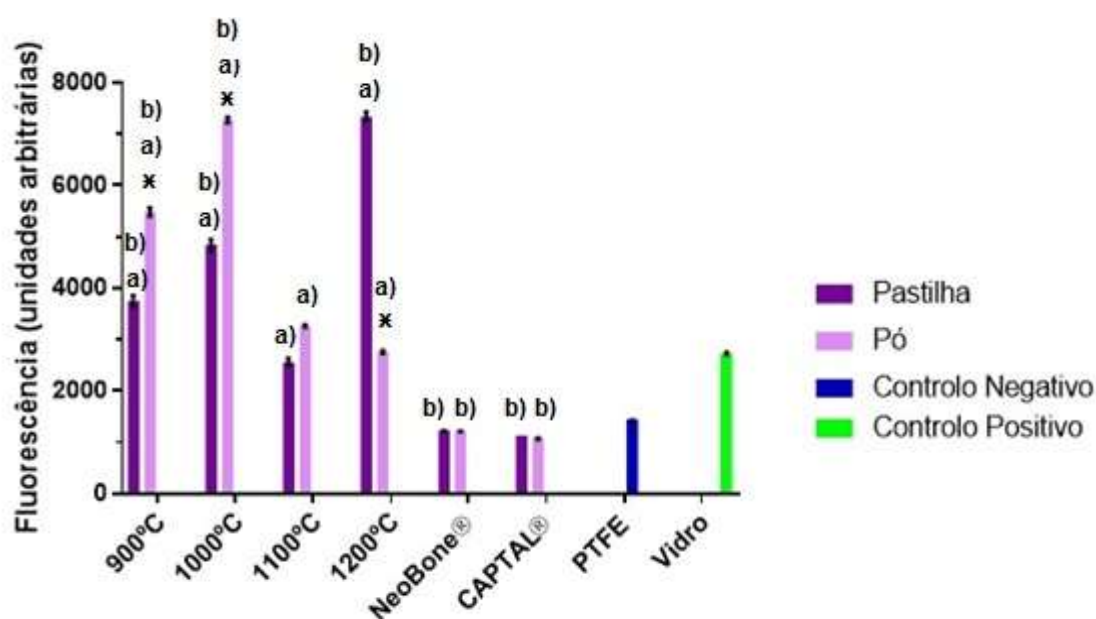


Figura 14 – Comparação do efeito induzido pelas pastilhas e pós de HAp calcinados a diferentes temperaturas, pelo controlo negativo (PTFE) e controlo positivo (Vidro) na ativação das plaquetas, ao averiguar a intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias) proveniente das plaquetas ativadas. Os dados encontram-se apresentados como média \pm S.E.M. (*standard error of the mean*). * $p < 0,05$ vs pastilhas de HAp; a) $p < 0,05$ vs controlo negativo (PTFE) e b) $p < 0,05$ vs controlo positivo (Vidro)

1.2.2. Hemostase secundária

Os resultados obtidos na avaliação da hemostase secundária mostraram que as pastilhas de HAp calcinadas a 900°C e 1000°C aumentaram significativamente o TTPa e o TP. No entanto, nenhum dos pós de HAp estudados alterou de forma significativa esses tempos (Figura 15 e 16). Além disso, a avaliação da cinética de coagulação do sangue total revelou que todas as pastilhas e pós de HAp eram menos trombogénicos que o controlo positivo (Vidro) e mais trombogénicos que o controlo negativo (PTFE) (Figuras 17 e 18). O estudo do perfil de recalcificação do plasma mostrou que todos os pós de HAp apresentavam um valor inferior ao controlo positivo utilizado (Figura 19).

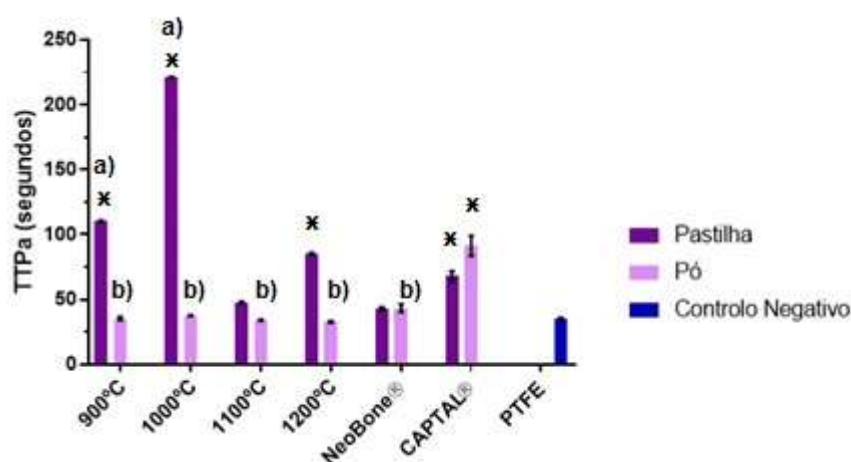


Figura 15 – Comparação do efeito induzido pelas pastilhas e pós de HAp calcinados a diferentes temperaturas e pelo controlo negativo (PTFE) no tempo de coagulação, nomeadamente no TTPa. Os dados encontram-se apresentados como média \pm S.E.M. (standard error of the mean). \times $p < 0,05$ vs controlo negativo (PTFE); **a)** $p < 0,05$ vs pastilhas de NeoBone® e CAPITAL® e **b)** $p < 0,05$ vs pós de CAPITAL®

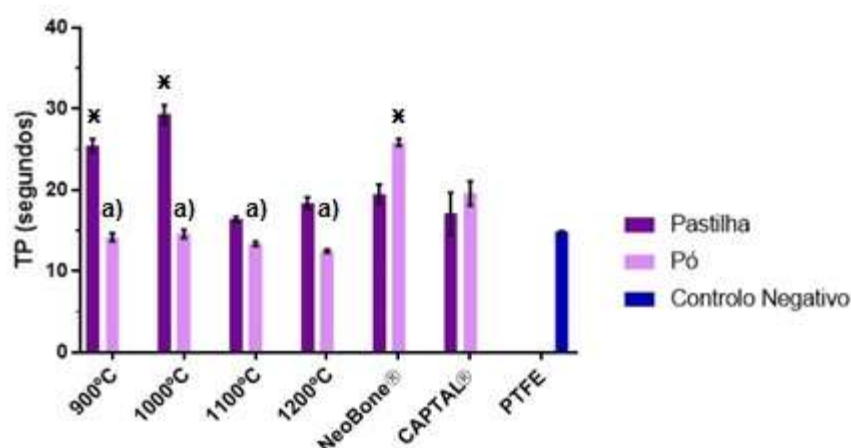


Figura 16 – Comparação do efeito induzido pelas pastilhas e pós de HAp calcinados a diferentes temperaturas e pelo controlo negativo (PTFE) no tempo de coagulação, nomeadamente no TP. Os dados encontram-se apresentados como média \pm S.E.M. (standard error of the mean). \times $p < 0,05$ vs controlo negativo (PTFE); **a)** $p < 0,05$ vs pós de NeoBone®

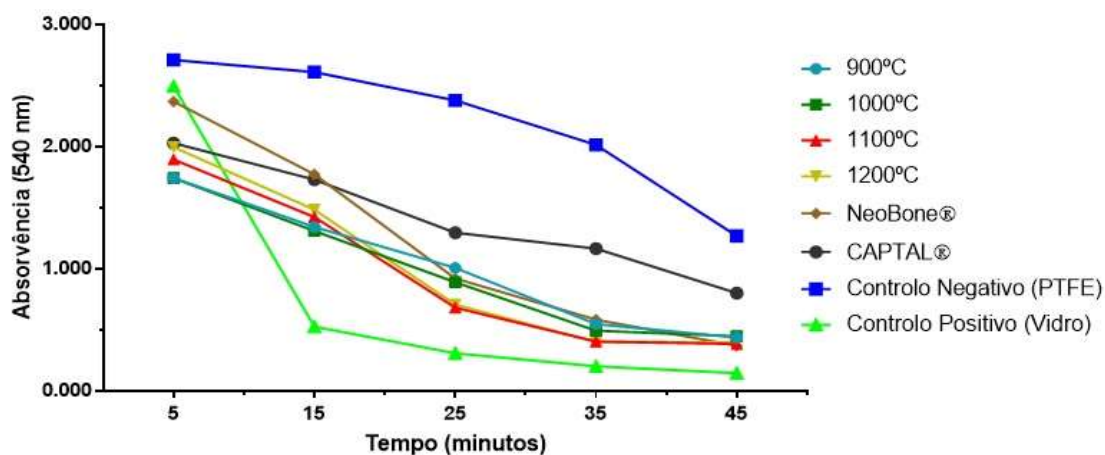


Figura 17 – Comparação do efeito induzido pelas pastilhas de HAp calcinadas a diferentes temperaturas, pelo controlo negativo (PTFE) e controlo positivo (Vidro) na cinética de coagulação do sangue total

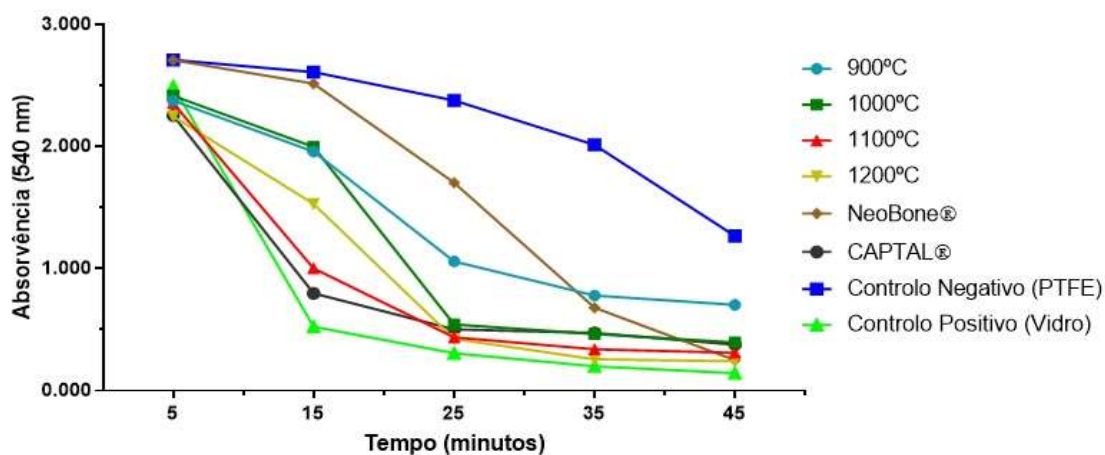


Figura 18 – Comparação do efeito induzido pelos pós de HAp calcinados a diferentes temperaturas, pelo controlo negativo (PTFE) e controlo positivo (Vidro) na cinética de coagulação do sangue total

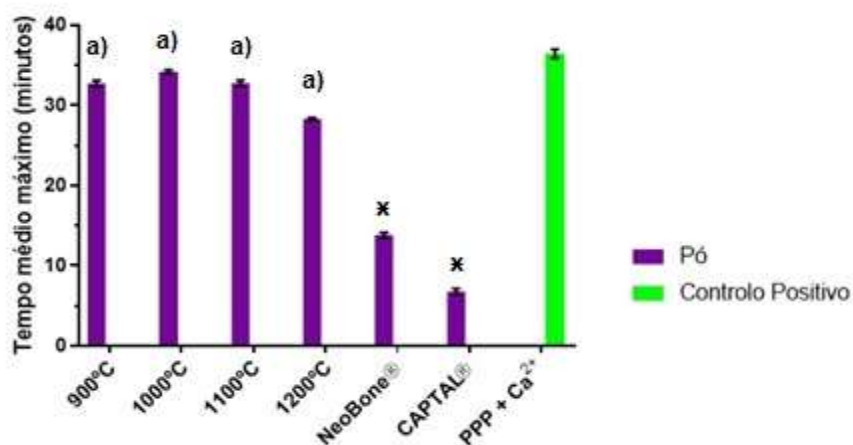


Figura 19 – Comparação do efeito induzido pelos pós de HAp calcinados a diferentes temperaturas (na concentração de 0,05 mg/mL) e pelo controlo positivo no tempo médio máximo da cinética de coagulação. Os dados encontram-se apresentados como média \pm S.E.M. (*standard error of the mean*). * $p < 0,05$ vs controlo positivo; a) $p < 0,05$ vs pós de NeoBone® e CAPTAL®

1. Avaliação *in vitro* da hemocompatibilidade

1.1. Estudo das propriedades hemostáticas

1.1.1. Hemostase primária

A ativação das plaquetas quantificada por citometria de fluxo revelou que as soluções de QsAPM e QsBPM de concentração 1 mg/mL apresentaram maior % de plaquetas ativadas em comparação com as restantes soluções em estudo, ao branco e ao controlo negativo (PTFE) (Figuras 20 e 21).

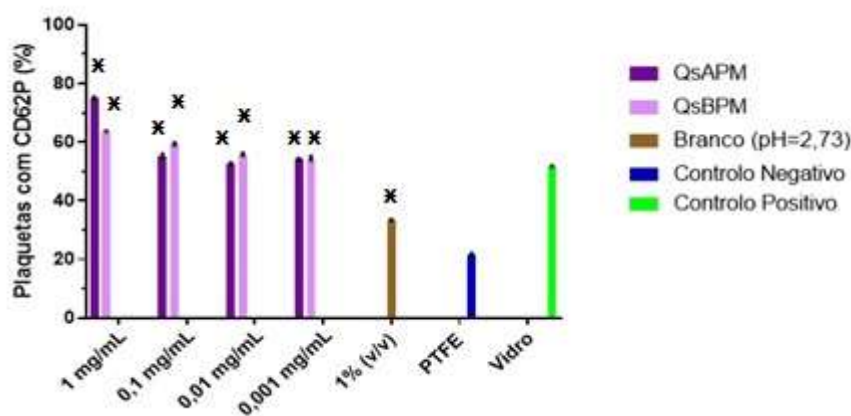


Figura 20 – Comparação do efeito induzido pelas soluções de QsAPM e QsBPM a diferentes concentrações na ativação das plaquetas, atendendo à % de plaquetas marcadas positivamente com CD62P/P-seletina. Os dados encontram-se apresentados como média \pm S.E.M. (*standard error of the mean*). * $p < 0,05$ vs controlo negativo (PTFE)

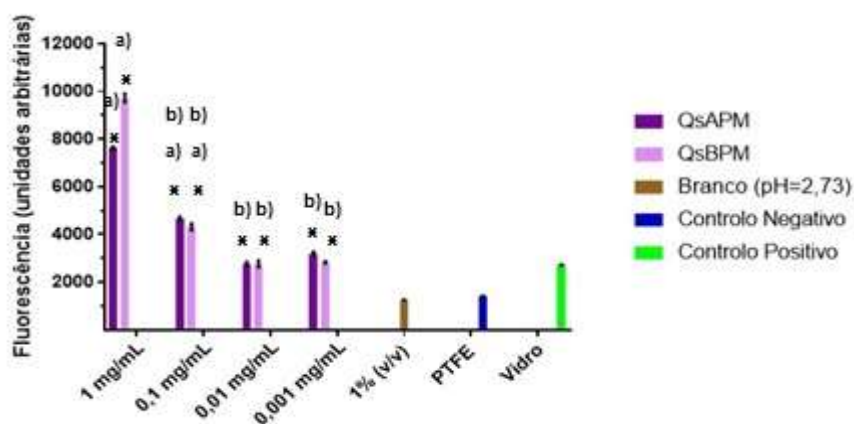


Figura 21 – Comparação do efeito induzido pelas soluções de QsAPM e QsBPM a diferentes concentrações na ativação das plaquetas, ao averiguar a intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias) proveniente das plaquetas ativadas. Os dados encontram-se apresentados como média \pm S.E.M. (*standard error of the mean*). * $p < 0,05$ vs controlo negativo (PTFE); **a)** $p < 0,05$ vs controlo positivo (Vidro); **b)** $p < 0,05$ vs concentração de 1 mg/mL

1.1.2. Hemostase secundária

Os resultados obtidos na avaliação da hemostase secundária mostraram que a dissolução de QsBPM em ácido acético 1% (v/v), pH = 2,73, reduziu o TTPa ao longo das sucessivas diluições (Figura 22). Contudo, o mesmo não se verificou com as soluções diluídas de QsAPM, cujos resultados mantiveram-se próximos do controlo negativo (PTFE). Além disso, também se verificou que a dissolução de QsAPM e QsBPM em ácido acético 1% (v/v), pH = 2,73, reduziu o TP (Figura 23). A avaliação da cinética de coagulação do sangue total revelou que todas as diluições de QsAPM e QsBPM eram menos trombogénicas que o vidro e mais trombogénicas que o PTFE, e ainda que as diluições de QsBPM eram globalmente menos trombogénicas do que as diluições de QsAPM (Figuras 24 e 25). O estudo do perfil de recalcificação do plasma mostrou que as diluições de QsAPM e QsBPM nas concentrações de 1 mg/mL e 0,1 mg/mL se encontravam acima do controlo positivo, enquanto as restantes diluições se situaram abaixo dele. Além disso, verificou-se uma relação dose-dependente nas concentrações de QsAPM e QsBPM neste estudo (Figura 26).

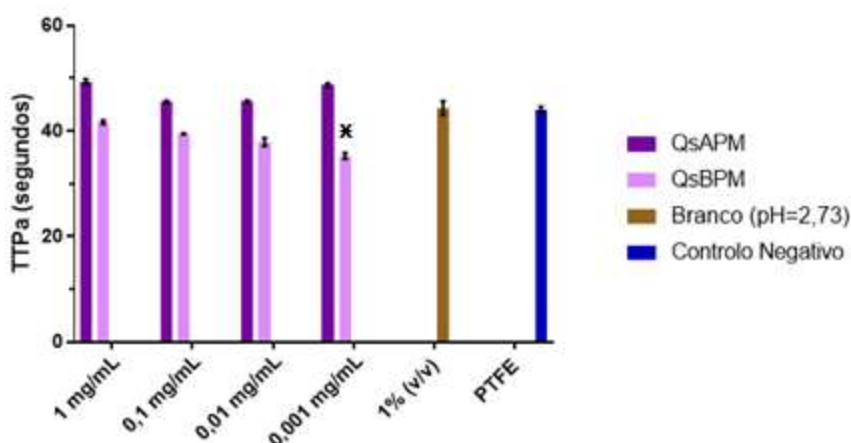


Figura 22 – Comparação do efeito induzido pelas soluções de QsAPM e QsBPM a diferentes concentrações, pelo branco e controlo negativo (PTFE) no tempo de coagulação, nomeadamente no TTPa. Os dados encontram-se apresentados como média \pm S.E.M. (*standard error of the mean*). * $p < 0,05$ vs QsAPM

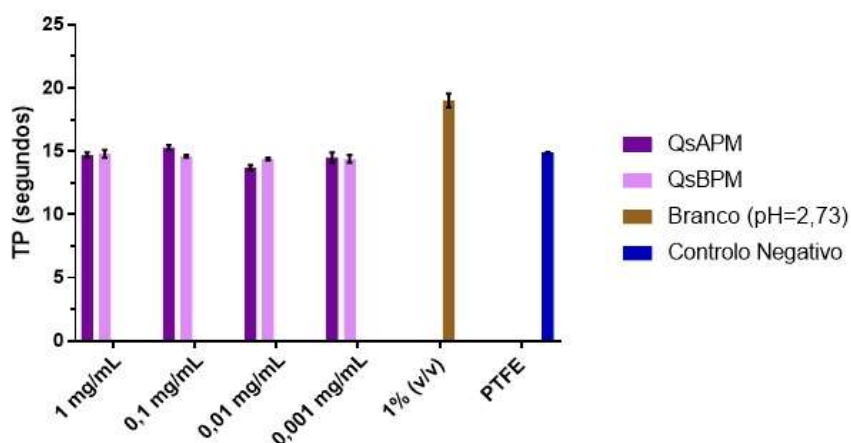


Figura 23 – Comparação do efeito induzido pelas soluções de QsAPM e QsBPM a diferentes concentrações, pelo branco e controlo negativo (PTFE) no tempo de coagulação, nomeadamente no TP. Os dados encontram-se apresentados como média \pm S.E.M. (*standard error of the mean*)

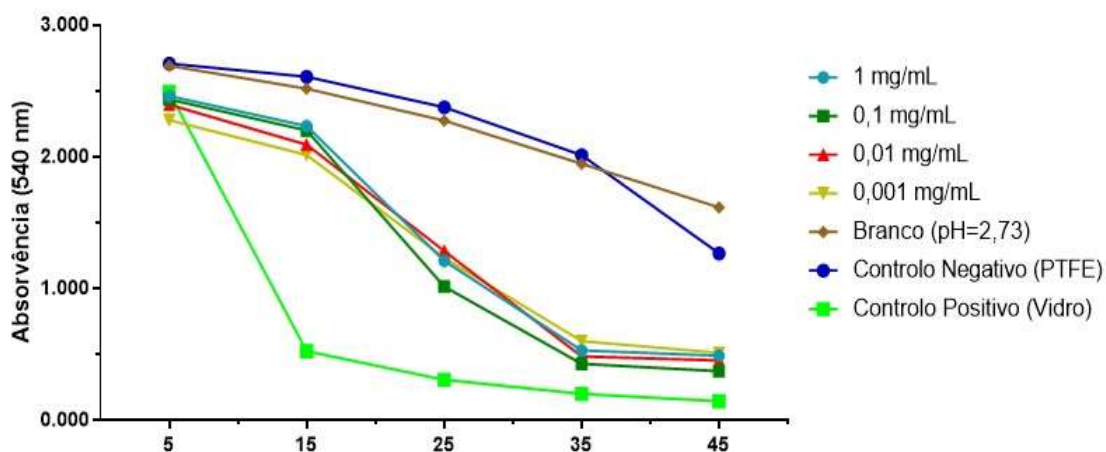


Figura 24 – Comparação do efeito induzido pelas soluções de QsAPM a diferentes concentrações, pelo branco, controlo negativo (PTFE) e controlo positivo (Vidro) na cinética de coagulação do sangue total

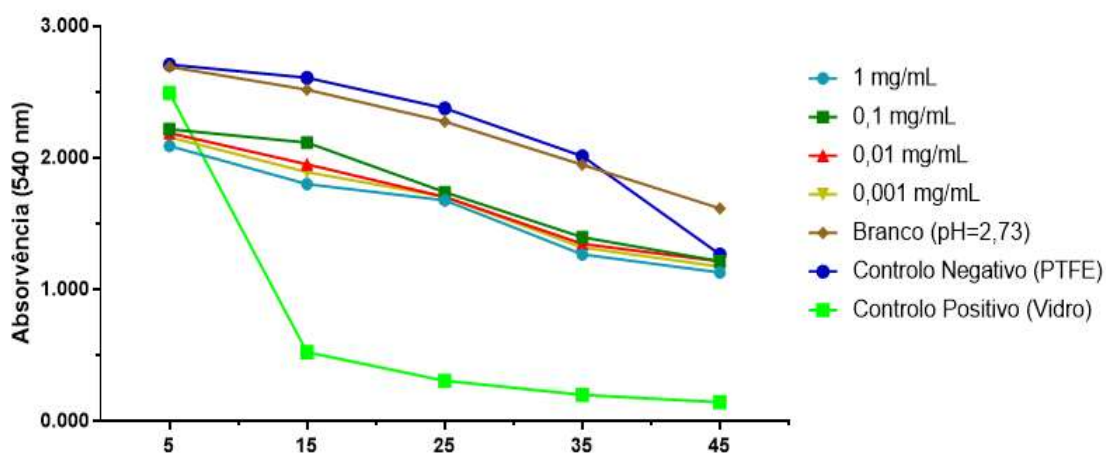


Figura 25 – Comparação do efeito induzido pelas soluções de QsBPM a diferentes concentrações, pelo branco, controlo negativo (PTFE) e controlo positivo (Vidro) na cinética de coagulação do sangue total

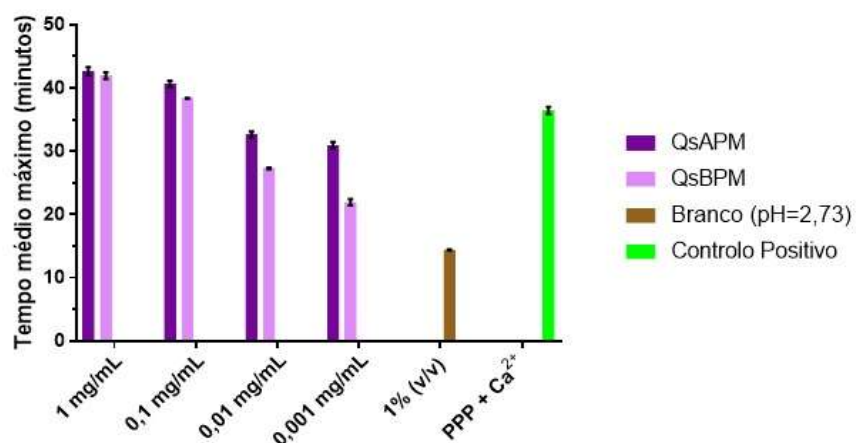


Figura 26 – Comparação do efeito induzido pelas soluções de QsAPM e QsBPM a diferentes concentrações, pelo branco e pelo controlo positivo no tempo médio máximo da cinética de coagulação. Os dados encontram-se apresentados como média \pm S.E.M. (*standard error of the mean*)

Parte V

Discussão

Neste trabalho pretendeu-se caracterizar e comparar o potencial de diferentes compostos à base de HAp e Qs de origem natural como possíveis biomateriais com interesse para uso clínico, avaliando as suas propriedades hemolíticas e hemostáticas *in vitro* de acordo com a norma ISO 10993 – *Biological Evaluation of Medical Devices*.

Na avaliação da HAp obtida a partir da calcinação de espinhas de Bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*), verificou-se que a HAp obtida por calcinação a 1100°C e 1200°C revelou-se não hemolítica (percentagem de hemólise < 2%) tanto nos pós, como previamente descrito na literatura⁴⁵, como nas pastilhas (Figura 11). No entanto, quando a HAp foi obtida por calcinação a 900°C e 1000°C, os resultados obtidos revelaram que esta HAp é hemolítica, uma vez que apresentou uma percentagem de hemólise superior a 5%, tanto para os pós como para as pastilhas. Verificamos na globalidade que o aumento da temperatura de calcinação está relacionado com uma diminuição da percentagem de hemólise. Este facto poderá estar relacionado com as diferentes densidades e tamanhos das partículas de HAp obtidas, tanto sob a forma de pó como em pastilha. De facto, a HAp obtida por calcinação a 900°C e 1000°C apresenta-se com granulações mais pequenas do que a HAp obtida por calcinação a 1100°C e 1200°C, o que poderá justificar os resultados obtidos. A incorporação de cálcio no pré-tratamento a que as espinhas de bacalhau foram submetidas antes da calcinação, poderá ser outro aspeto a considerar, uma vez que os iões de cálcio preenchem os espaços livres na estrutura química da HAp aumentando a sua pureza e densidade, tal como sugere o estudo desenvolvido por Piccirilo *et al.*⁴⁵

Verificou-se ainda que as pastilhas de HAp são mais hemolíticas do que os pós às mesmas temperaturas de calcinação, em particular a 900°C e 1000°C. Este resultado está provavelmente relacionado com o efeito mecânico que as pastilhas exercem durante o período de incubação, tendo-se demonstrando menor impacto nas pastilhas calcinadas a 1100°C e 1200°C pela presença de maior porosidade nas suas superfícies que afetam a mecânica dos fluidos.

Na avaliação das propriedades hemostáticas, em particular ao nível da hemóstase primária, a análise por SEM e por citometria de fluxo permitiu-nos avaliar o grau de ativação das plaquetas sobre as superfícies das pastilhas de HAp (Figura 12).

A observação efetuada às superfícies das pastilhas de HAp (Figura 12 – A, B, C e D) confirma um aspeto anteriormente abordado e que compreende a variação granulométrica das partículas de HAp à medida que a temperatura de calcinação aumenta.⁴⁵ Em relação às amostras comerciais de HAp, a diferença que se observa entre superfícies após calcinação está dependente das dimensões das partículas de

origem, uma vez que as partículas NeoBone® apresentam um diâmetro entre 500 e 1000 µm, sendo superior ao das partículas CAPTAL® com um diâmetro entre 2 e 4 µm. Em relação à ativação das plaquetas, as imagens de SEM mostram que as pastilhas de HAp calcinadas às temperaturas de 900°C e 1100°C e as pastilhas de CAPTAL® são as que se apresentam menos ativadas, e as pastilhas de HAp calcinadas às temperaturas de 1000°C e 1200°C e as pastilhas de NeoBone® são as que apresentam maior grau de ativação. Estes resultados foram confirmados por citometria de fluxo, em que a ativação das plaquetas foi avaliada através da expressão do CD62P à sua superfície, evidenciando que as pastilhas e pós de HAp calcinadas a 1000°C e as pastilhas de HAp calcinadas a 1200°C são os biomateriais que maior percentagem de plaquetas ativam pelo contacto. Estes resultados devem-se provavelmente às propriedades hidrofóbicas relacionadas com as temperaturas de calcinação. Além disso, estes resultados demonstram que estes biomateriais ativam a hemostase primária e, como tal, o seu uso deverá ser limitado a dispositivos que possam eventualmente beneficiar destas propriedades.

De notar que a ativação das plaquetas pode estar relacionada com a adsorção de proteínas plasmáticas pelo biomaterial, sendo o fibrinogénio a proteína que mais facilmente é adsorvida pelos materiais.³⁸ Ao fixar-se sobre uma superfície o fibrinogénio promove a ligação das plaquetas via recetores específicos (glicoproteínas IIb/IIIa), com consequente agregação de mais plaquetas e concomitante libertação de agentes pró-coagulantes.⁷² Importa ainda salientar que uma maior concentração de fibrinogénio presente numa superfície não é sinónimo de maior ativação das plaquetas e vice-versa, pois dependerá da conformação adquirida pelo fibrinogénio no momento em que este se liga nas superfícies.^{73,74} A natureza da superfície dos materiais também condiciona a adesão das plaquetas, uma vez que superfícies carregadas negativamente são responsáveis pela repulsão eletrostática impedindo que as plaquetas se possam aderir.³⁸ Para além disso, o balanço entre as propriedades hidrofílicas/hidrofóbicas das superfícies dos materiais também deve ser considerado, dado que as plaquetas aderem mais frequentemente às superfícies hidrofílicas mantendo uma conformação esférica, do que às superfícies hidrofóbicas onde manifestam maior ativação.⁷⁵

Relativamente à hemóstase secundária, a avaliação da ativação da cascata da coagulação, constitui um elemento de enorme importância pois permite avaliar a compatibilidade sanguínea dos biomateriais. Neste estudo, as pastilhas de HAp calcinadas a 900°C e 1000°C afetam de forma significativa a via intrínseca e a via extrínseca da cascata da coagulação ao aumentar o TTPa e TP, respetivamente (Figuras 15 e 16). Estes resultados apontam no sentido destes biomateriais apresentarem propriedades anticoagulantes, ao contrário do que acontece nas restantes temperaturas em estudo, onde

as pastilhas de HAp não afetam de modo significativo o TTPa e TP, cujos valores encontram-se próximos do controlo negativo (PTFE). Por sua vez, os pós de NeoBone® e de CAPTAL® afetam de modo significativo estas vias ao aumentar o TTPa e TP, respetivamente (Figuras 15 e 16). Estes resultados revelam que estes biomateriais podem apresentar propriedades anticoagulantes, ao contrário dos restantes pós calcinados a diferentes temperaturas, cujos valores são semelhantes ao controlo negativo (PTFE). Globalmente, tanto as pastilhas como os pós de HAp avaliados mostram ser mais trombogénicos do que o controlo negativo (PTFE) e menos trombogénicos do que o controlo positivo (Vidro). No entanto, as pastilhas de CAPTAL® e os pós de Neobone® são menos trombogénicos que todos os outros biomateriais analisados (Figuras 17 e 18). Ao avaliar o perfil de recalcificação do plasma com todos os pós de HAp verifica-se que os biomateriais calcinados entre 900°C e 1200°C apresentam um comportamento normal por comparação ao controlo positivo (PPP + Ca²⁺), enquanto os pós de NeoBone® e CAPTAL® significativamente reduzem o tempo de coagulação do plasma, o que contraria os resultados anteriormente obtidos e, por isso, ser aconselhado realizar uma confirmação às amostras comerciais de HAp (Figura 19). O teste de recalcificação do plasma não foi realizado às pastilhas de HAp, pois iriam obstruir por completo a passagem da radiação incidente do equipamento de leitura.

Em relação aos Qs avaliados, a atividade hemolítica não foi realizada por haver na literatura dados referentes a estas soluções de Qs.⁶⁴ Adicionalmente foi ainda demonstrado que as soluções de Qs preparadas com ácido acético 1% (v/v) (não neutralizadas) são hemolíticas. Esta propriedade é adquirida pela extensa protonação dos grupos funcionais amina da molécula (Figura 10), a qual fica carregada positivamente, sendo responsável pelas fortes atrações eletrostáticas com as glicoproteínas aniónicas presentes na superfície dos eritrócitos, promovendo modificações conformacionais na sua membrana que conduzem à hemólise.^{64,69,76}

Na avaliação das propriedades hemostáticas, em particular ao nível da hemóstase primária, a análise por SEM não foi realizada às soluções de QsAPM e QsBPM por não se tratar de um material com superfície sólida. A quantificação da ativação plaquetária realizada por citometria de fluxo (Figura 20) permite avaliar o grau de ativação das plaquetas quando em contacto com as soluções de Qs (QsAPM e QsBPM). Os nossos resultados demonstram que a ativação das plaquetas é dose-dependente, visto que a diminuição da concentração acompanha uma redução da percentagem de plaquetas ativadas. Ao observar as intensidades de fluorescência emitidas pelas plaquetas ativadas (Figura 21) confirma-se os resultados obtidos para ambas as soluções de Qs.

A avaliação das propriedades hemostáticas, nomeadamente ao nível do estudo da ativação da cascata da coagulação (hemostase secundária), constitui um elemento de enorme importância pois permite avaliar a compatibilidade sanguínea dos biomateriais. Neste estudo, as soluções diluídas de QsAPM não afetam a via intrínseca e a via extrínseca da cascata da coagulação (Figuras 22 e 23), apresentando valores de TTPa e TP semelhantes ao controlo negativo (PTFE). Por sua vez, as soluções de QsBPM também não afetam estas vias da cascata da coagulação (Figuras 22 e 23), apresentando valores de TTPa e TP também próximos do controlo negativo (PTFE). De modo a confirmar os resultados obtidos nos ensaios do tempo de coagulação (TTPa e TP), realizou-se o ensaio da cinética do tempo de coagulação do sangue total para todas as soluções de Qs (Figuras 24 e 25). Todas as soluções de Qs avaliadas mostram ser mais trombogénicas do que o controlo negativo (PTFE) e menos trombogénicas do que o controlo positivo (Vidro). No entanto, as soluções de QsAPM são mais trombogénicas (Figura 24) do que as soluções de QsBPM (Figura 25), devendo-se provavelmente à viscosidade que o QsAPM confere às soluções. Ao avaliar o perfil de recalcificação do plasma em todas as soluções de Qs (Figura 26), verifica-se a existência de uma relação dose-dependente com a concentração de Qs, ou seja, quanto menor for a concentração de Qs menor é o tempo necessário para coagular 50% do plasma, e vice-versa.

Em conclusão, os nossos resultados demonstram que a HAp obtida por calcinação de espinhas a 900°C e 1000°C revela-se hemolítica (percentagem de hemólise > 5%) tanto nos pós como nas pastilhas e não trombogénica atendendo à globalidade dos resultados obtidos na avaliação das suas propriedades hemostáticas, enquanto que a HAp obtida por calcinação de espinhas a 1100°C e 1200°C revela-se não hemolítica (percentagem de hemólise < 2%) tanto para os pós como para as pastilhas e também não trombogénica. Em relação aos Qs avaliados, as soluções de QsAPM mostram ser, de um modo geral, mais trombogénicas do que as soluções de QsBPM nas várias concentrações em estudo.

Parte VI

Referências

1. Elam J, Nygren H (1992) Adsorption of coagulation proteins from whole blood to polymer materials: relation to platelet activation. *Biomaterials* 13: 3-8
2. Braune S, Hoenow A, Mrowietz C (2011) Hemocompatibility of soft hydrophobic poly(n-butyl acrylate) networks with elastic moduli adapted to the elasticity of human arteries. *Clin Hemorheol Micro* 49: 375-390
3. Alexander J, Singh K (2005) Inhibition of factor Xa: a potential target for the development of new anticoagulants. *Am J Cardiovasc Drugs* 5:279-290
4. Sinnaeve P, Werf F (2004) Will oral antithrombin agents replace warfarin? *Heart* 90:827-828
5. Schulman S, *et al.* (2003) Secondary prevention of venous thromboembolism with the oral direct thrombin inhibitor ximelagatran. *N Engl J Med* 349:1713-1721
6. Fauci A, *et al.* (2008) *Harrison's principles of internal medicine*. New York: McGraw-Hill Medical
7. Weitz J, Hirsh J, Samama M (2008) New antithrombotic drugs: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines (8th edition) *Chest* 133:234S-256S
8. Alexandre N, *et al.* (2014) Biocompatibility and hemocompatibility of polyvinyl alcohol hydrogel used for vascular grafting – *In vitro* and *in vivo* studies. *J Biomed Mater Res-A* 102(12):4262-75
9. Haas S (2008) The threat of thromboembolism - addressing unmet need in the prevention of VTE after major orthopaedic surgery. Oxford: Bayer HealthCare
10. Jobin F (1995) *L'Hémostase*. Les Presses de L'Université Laval, Editions Maloine
11. Colman R, Clowes A, Goldhaber S, Marder V, George J (2006) Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. 5^a Ed, Lippincott Williams & Wilkins
12. Stassen J, Arnout J, Deckmyn H (2004) The hemostatic system. *Curr Med Chem* 11:2245-2260
13. Moreira A, Coelho T (2001) Função hemostática e sua avaliação. Texto de apoio, Serviço de Fisiologia Faculdade de Medicina da Universidade do Porto
14. Quinones-Hinojosa A, Gukati M, Singh V, Lawton M (2003) Spontaneous intracerebral hemorrhage due to coagulation disorders. *Neurosurg Focus* 15(4)
15. Batty P, Graham Smith J (2010) Haemostasis. *Surgery* 530–535

16. Staton C, Lewis C (2005) Angiogenesis inhibitors found within the haemostasis pathway. *J Cell Mol Med* 9(2): 286-302
17. Moake J (2016) MSD Manual - Overview of Hemostasis. Kenilworth, NJ, USA
18. Stavrou E, Schmaier A (2010) Factor XII: what does it contribute to our understanding of the physiology and pathophysiology of hemostasis & thrombosis. *Thromb Res* 125(3): 210–5
19. Hoffman M (2003) Remodeling the blood coagulation cascade. *J Thromb Thrombolysis* 16(1): 17-20
20. Butenas S, Mann K (2002) Review: Blood coagulation. *Biochemistry (Moscow)* 67(1): 3-12
21. McMichael M (2012) New models of hemostasis. *Top Companion Anim Med* 27(2): 40–5
22. Turpie A (2007) Oral, direct factor Xa inhibitors in development for the prevention and treatment of thromboembolic diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(6):1238-47
23. World Health Organization (2014) Global Health Observatory data repository. Acedido a 27 de junho de 2016, em <http://apps.who.int/gho/data/node.home>
24. Costa E, Santos-Silva A, Paúl C, Gallego J (2015) Aging and Cardiovascular Risk. *BioMed Research International*
25. World Health Organization (2016) Global status report of noncommunicable diseases 2014. Acedido a 27 de junho de 2016, em <http://www.who.int/mediacentre/noncommunicable-diseases/en/>
26. Paul C, Robert M (2004) Bioengineering: 25 years of progress – but still only a beginning. *Technol Soc* 26(2):415-31
27. Bhat S, Kumar A (2013) Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. *Biomatter* 3(3)
28. Chia H, Wu B (2015) Recent advances in 3D printing of biomaterials. *J Biomed Eng* 9:1-14
29. Williams DF (2009) On the nature of biomaterials. *Biomaterials* 30:5897-5909
30. Williams DF (1987) Definitions in biomaterials. Amsterdam: Elsevier
31. Clinical Applications of Biomaterials (1982) NIH Consens Statement Nov 1-3, 4(5):1-19

32. Huebsch N, Mooney DJ (2009) Inspiration and application in the evolution of biomaterials. *Nature* 462(7272):426-32
33. Kaszala K, Ellenbogen KA (2010) Sensors and Algorithms for Pacemakers and Implantable Cardioverter Defibrillators. *Circulation* 122(13):1328-40
34. Hosseinkhani H, Ou K-L (2014) Development of 3D in Vitro Technology for Medical Applications. *Int J Mol Sci* 15:17938-62
35. Huebsch N, Mooney DJ (2009) Inspiration and application in the evolution of biomaterials. *Nature* 462(7272):426-32
36. Serruys PW, *et al.* (2011) Evaluation of the second generation of a bioresorbable everolimus-eluting vascular scaffold for the treatment of de novo coronary artery stenosis: 12-month clinical and imaging outcomes. *J Am Coll Cardiol* 58(15):1578-88
37. ISO 10993. Biological evaluation of medical devices.
38. van Oeveren W (2013) Obstacles in Haemocompatibility Testing. *Scientifica*
39. Steffen B, Grunze M, Straub A, Jung F (2013) Are there sufficient standards for the in vitro hemocompatibility testing of biomaterials? *Biointerphases* 8:33
40. ISO 10993-4:2002 Biological evaluation of medical devices – Part 4: Selection of tests for interactions with blood.
41. Ferraro V, *et al.* (2010) Valorisation of natural extracts from marine source focused on marine by-products: A review. *Food Res Int* 43:2221-33
42. Aranov D, Karlov A, Rosenman G (2007) Hydroxyapatite nanoceramics: Basic physical properties and biointerface modification. *J Eur Ceram Soc* 27:4181-86
43. Barakat NAM, *et al.* (2008) Physiochemical characterizations of hydroxyapatite extracted from bovine bones by three different methods: Extraction of biologically desirable HAp. *Mater Sci Eng C* 28:1381-87
44. Piccirillo C, *et al.* (2013) Extraction and characterization of apatite- and tricalcium phosphate-based materials from cod fish bones. *Mater Sci Eng C* 33:103-10
45. Piccirillo C, *et al.* (2015) Hydroxyapatite-based materials of marine origin: A bioactivity and sintering study. *Mater Sci Eng C* 51:309-15
46. Dorozhkin SV (2010) Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials* 31(7):1465-1485

47. Cho JS, Yoo DS, Chung YC, Rhee SH (2014) Enhanced bioactivity and osteoconductivity of hydroxyapatite through chloride substitution. *J Biomed Mater Res A* 102(2):455-69
48. Eslami H, Solati-Hasjin M, Tahriri M (2009) The comparison of powder characteristics and physicochemical, mechanical and biological properties between nanostructure ceramics of hydroxyapatite and fluoridated hydroxyapatite. *Mater Sci Eng C* 29(4):1387-89
49. LeGeros RZ (2008) Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chemical Reviews* 108(11):4742-53
50. Abden MJ, Afroze JD, Alam MS, Bahadur NM (2016) Pressureless sintering and mechanical properties of hydroxyapatite/functionalized multi-walled carbon nanotube composite. *Mater Sci Eng C* 67:418-24
51. Palanivelu R, Ruban Kumar A (2014) Synthesis, characterization, in vitro anti-proliferative and hemolytic activity of hydroxyapatite. *Spectrochim Acta A* 127:434-8
52. Radha G, Balakumar S, Venkatesan B, Vellaichamy E (2015) Evaluation of hemocompatibility and in vitro immersion on microwave-assisted hydroxyapatite-alumina nanocomposites. *Mater Sci Eng C* 50:143-50
53. Subramanian B, Dhandapani P, Maruthamuthu S, Jayachandran M (2012) Biosynthesis of calcium hydroxylapatite coating on sputtered Ti/TiN nano multilayers and their corrosion behavior in simulated body solution. *J Biomater Appl* 26(6):687-705
54. Venkatesan P, *et al.* (2011) The potential of celecoxib-loaded hydroxyapatite-chitosan nanocomposite for the treatment of colon cancer. *Biomaterials* 32(15):3794-806
55. Vedakumari WS, Priya VM, Sastry TP (2014) Deposition of superparamagnetic nanohydroxyapatite on iron-fibrin substrates: preparation, characterization, cytocompatibility and bioactivity studies. *Colloid Surface B* 120:208-14
56. Mano JF, Sousa RA, Boesel LF, Neves NM, Reis RL (2004) Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: State of the art and recent developments. *Compos Sci Technol* 64:789-817
57. Salgado AJ, Coutinho O, Reis L (2004) Bone tissue engineering: State of the art and future trends. *Macromol Biosci* 4:743-65
58. Woodard RJ, *et al.* (2007) The mechanical properties of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials* 28:45-54

59. Piccirillo C, *et al.* (2014) A hydroxyapatite-Fe₂O₃ based material of natural origin as an active sunscreen filter. *J Mater Chem B* 2:5999-6009
60. Fernandes JC, *et al.* (2011) Cytotoxicity and genotoxicity of chitooligosaccharides upon lymphocytes. *Int J Biol Macromol* 49:433-38
61. Fernandes JC, *et al.* (2008) Effects of Chitooligosaccharides on Human Red Blood Cell Morphology and Membrane Protein Structure. *Biomacromolecules* 9:3346-52
62. Younes I, Rinaudo M (2015) Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Mar* 13:1113-74
63. Xu L, *et al.* (2013) Nonionic polymer cross-linked chitosan hydrogel: preparation and characterization. *J Biomat Sci-Polym E* 24(13):1564-74
64. Wu M, *et al.* (2014) In vitro drug release and biological evaluation of biomimetic polymeric micelles self-assembled from amphiphilic deoxycholic acid-phosphorylcholine-chitosan conjugate. *Mater Sci Eng C* 45:162-9
65. Wang R, Neoh KG, Kang ET (2015) Integration of antifouling and bactericidal moieties for optimizing the efficacy of antibacterial coatings. *J Colloid Interf Sci* 438:138-48
66. Wang X, *et al.* (2016) Improvement in physical and biological properties of chitosan/soy protein films by surface grafted heparin. *Int J Biol Macromol* 83:19-29
67. Song X, *et al.* (2014) Synthesis, biocompatible, and self-assembly properties of poly (ethylene glycol)/lactobionic acid-grafted chitosan. *J Biomat Sci-Polym E* 25(10):1062-75
68. Lee HS, Tomczyk N, Kandel J, Composto RJ, Eckmann DM (2013) Hemocompatibility of Chitosan/poly (acrylic acid) Grafted Polyurethane Tubing. *J Mater Chem B* 1(46)
69. Nadesh R, *et al.* (2013) Hematotoxicological analysis of surface-modified and - unmodified chitosan nanoparticles. *J Biomed Mater Res A* 101(10):2957-66
70. Frydrychowicz A, *et al.* (2012) Hepatobiliary MR imaging with gadolinium-based contrast agents. *J Magn Reson Imaging* 35:492-511
71. Motlagh D, Yang J, Lui KY, Webb AR, Ameer GA (2006) Hemocompatibility evaluation of poly (glycerol-sebacate) in vitro for vascular tissue engineering. *Biomaterials* 27:4315-24
72. Savage B, Saldívar E, Ruggeri ZM (1996) Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 84(2):289-97

- 73 Sivaraman B, Latour RA (2010) The relationship between platelet adhesion on surfaces and the structure versus the amount adsorbed fibrinogen. *Biomaterials* 31(5):832-9
- 74 Sivaraman B, Latour RA (2011) Delineating the roles of the GPIIb/IIIa and GP-Ib-IX-V platelet receptors in mediating platelet adhesion to adsorbed fibrinogen and albumin. *Biomaterials* 32(23):5365-70
- 75 Cen CJ, Hui-Mei LI, Wang JS, Chen HI, Usami S (1996) Flow-induced detachment of adherent platelets from fibrinogen-coated surface. *Am J Physiol* 270:H160-6
- 76 Shelma R, Sharma CP (2011) Development of lauroyl sulfated chitosan for enhancing hemocompatibility of chitosan. *Colloid Surface B* 84(2):561-70